

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE DA ROSA ALMEIDA

COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO DE MALTE: FENÓLICOS, CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE IN VITRO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

CURITIBA  
2014

ALINE DA ROSA ALMEIDA

COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO DE MALTE: FENÓLICOS, CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE IN VITRO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Engenharia Química, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk

Co-orientadora: Profa. Dra. Marcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini

CURITIBA  
2014

---

A447c

Almeida, Aline Rosa

Compostos bioativos do bagaço de malte : fenólicos, capacidade antioxidante *in vitro* e atividade antibacteriana / Aline Rosa Almeida. – Curitiba, 2014.

74f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2014.

Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk – Coorientador: Marcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini.

Bibliografia: p. 64-74.

1. Fenóis. 2. Antioxidantes. 3. Flavonóides. 4. Antocianinas. 5. Malte. I. Universidade Federal do Paraná. II. Haminiuk, Charles Windson Isidoro III. Perdoncini, Marcia Regina Ferreira Geraldo. IV. Título.

CDD: 663.31

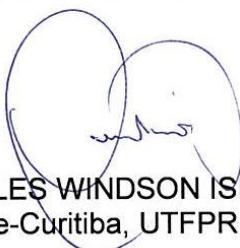
---

**ALINE DA ROSA ALMEIDA**

**COMPOSTOS BIOATIVOS DO BAGAÇO DE MALTE:  
FENÓLICOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO E  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientador:



Prof. Dr. CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK  
Campus Ecoville-Curitiba, UTFPR



Profª Drª. GISELE MARIA MACIEL  
Campus Ecoville-Curitiba, UTFPR



Profª Drª. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI  
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 01 de abril de 2014.

A Deus que supre todas as  
minha necessidades e a minha  
família pelo apoio, amor e  
compreensão em todos os  
momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por estar comigo sempre me dando discernimento, mostrando sempre o melhor caminho a seguir, me dando força e me sustentou espiritualmente durante estes dois últimos anos em especial.

Aos meus pais queridos, Neivaldo e Vera, minha irmã Andressa, que me apoiaram nos momentos de dificuldades, me dando força, coragem, carinho e comemoraram comigo nos momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, pela orientação, apoio e pela confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Marcia Regina Ferreira Geraldo Perdoncini, pela co-orientação, pelos conhecimentos transmitidos, por ter estado sempre à disposição para esclarecer todas as minhas dúvidas e pela amizade.

À MSc Engenheira de Alimentos Leomara Floriano Ribeiro, que me ajudou muito durante os dois últimos anos, me acompanhando, dando sugestões importantes e ensinando.

Ao MSc Tecnologia de Alimentos Marcos Vieira por sempre me auxiliar com seus conhecimentos técnicos e disponibilizar material necessário por meio da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Campo Mourão para as análises em Cromatografia Gasosa.

À Profa. Dra. Rosemary Hoffmann Ribani, pelos conhecimentos transmitidos, por estar sempre à disposição para esclarecer eventuais dúvidas e sugestões.

Ao técnico de laboratório, Marcelo Zadorecki pela disponibilidade, cooperação e paciência no decorrer desse trabalho.

Aos meus primos Alice, Ariene, Eduardo, Helena, Thiago, Luciana, Mariana, Marlon e tias Aparecida, Neide e toda a minha família pelo apoio, incentivo e muitas vezes me acolher em suas casas.

Aos amigos da igreja Alva, Ana Carolina, Eduardo, Pastor Tiago, Josiane, Angela, Joane, Lucelia, Dejair e aos demais que certamente sempre estiveram orando por mim.

A empresa Bier Hoff que gentilmente doou as amostras utilizadas neste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, em especial aos queridos amigos que conquistei durante este período, Adriano, Aline, Caroline, Cintia, Daniela, Fabiane, Fernanda Fiorda, Laís, Lizandra, Luana, Marcelo, Marciele, Paloma, Gerson e Rafael, aos amigos Fernanda Perico, Larissa, Matheus, Marilei, Talyta e Vanessa, obrigada pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

“O caminho de cada um é feito pelos próprios passos, mas a beleza da caminhada depende de quem vão conosco.” Antônio A. F. Coppe

**Muito Obrigada!!!**

*“Bem sei eu que tudo podes, e nenhum  
dos teus planos pode ser frustrados”  
Jó 42:2*



## RESUMO

Este estudo caracterizou o resíduo sólido gerado após a etapa de filtragem no processo de fabricação de cerveja *Pilsen* puro malte, sendo este, oriundo do grão de malte e denominado bagaço de malte, que mesmo apresentando compostos bioativos, vêm sendo meramente utilizados na alimentação animal. A partir da extração de compostos fenólicos totais em etanol:água (20:80) obtendo  $380,28 \pm 59,99$  mg/100g EAG foram realizadas análises posteriores. Observou-se teores significativos de flavonoides totais ( $149,37 \pm 0,09$  mg/100g QE), por outro lado não constatou-se valores significativos para antocianinas totais ( $0,012 \pm 0,001$  mg/g). Foram detectados cinco ácidos graxos principais, dentre eles os insaturados: ácidos oleico, linoleico e linolênico, e os saturados: ácido palmítico e uma pequena fração de esteárico. Os compostos fenólicos ácido siríngico, catequina, ácido gálico e caempferol foram detectados no bagaço de malte por CLAE, sendo estes compostos contribuintes para a atividade antioxidante neste resíduo. A atividade antioxidante foi determinada por diferentes metodologias:  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, ABTS<sup>++</sup>, atividade quelante do íon ferroso e DPPH<sup>•</sup> sendo que todos obtiverem resultados expressos por EC<sub>50</sub>, tendo-se o DPPH<sup>•</sup> destacado-se por sua melhor eficiência nos resultados. O potencial antimicrobiano foi avaliado, porém não foi observada atividade antibacteriana em relação às bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium* nas concentrações (0,01; 0,1; 1; 50 mg/mL) testadas. Os resultados obtidos mostraram que existe correlação entre atividade antioxidante e compostos fenólicos no bagaço de malte. Sendo assim, o resíduo analisado pode ser considerado fonte de compostos bioativos ao qual se atribui elevada atividade antioxidante.

Palavras-chave: Compostos fenólicos, atividade antioxidante, flavonoides, antocianinas, malte.

## ABSTRACT

Solid waste produced after the filtering stage in pure malt Pilsen beer manufacturing process was characterized. Although malt bagasse from malt grain has bioactive compounds, it is normally used for animal feed. The extraction of total phenolic compounds in ethanol: water (20:80) with  $380.28 \pm 59.99$  mg/100g GAE was used for later analyses. Significant amount of flavonoid ( $149.37 \pm 0.09$  mg/100g QE) was found in the sample, whereas the total anthocyanin amount observed was not significant ( $0.012 \pm 0.001$  mg/g). Five main fatty acids were detected, among which may be mentioned the unsaturated oleic, linoleic, linolenic acids and the saturated palmitic acid with a small fraction of stearic acid. The phenolic compounds syringic acid, catechin, gallic acid and kaempferol were reported in malt bagasse by CLAE. The compounds contributed towards the residue's antioxidant activity. Antioxidant activity was determined by several methodologies:  $\beta$ -carotene/linoleic acid, ABTS<sup>•+</sup>, chelating activity of ferrous ion and DPPH<sup>•</sup>, all of which had results expressed by  $EC_{50}$ . However, DPPH<sup>•</sup> had the highest efficiency in results. Although antimicrobial potential was evaluated, no antibacterial activity was detected with regard to bacteria *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella typhimurium* in concentrations (0.01; 0.1; 1; 50 mg/mL) under analysis. Results revealed that there is a co-relationship between antioxidant activity and phenolic compounds in malt bagasse. The waste analyzed may be a source of bioactive compounds with high antioxidant activity.

Keywords: phenolic compounds; antioxidant activity; flavonoids; anthocyanins; malt.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA FABRICAÇÃO DE CERVEJA.....	20
FIGURA 2 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL ABTS <sup>•+</sup> POR UM ANTIOXIDANTE E SUA FORMAÇÃO PELO PERSULFATO DE POTÁSSIO.....	27
FIGURA 3 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE.....	27
FIGURA 4 - ESTRUTURA, NOME E LOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS ANTOCIANINAS.....	30
FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁLCOOL ETÍLICO.....	47
FIGURA 6 - CROMATOGRAMA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS ÉSTERES METÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DE AMOSTRA DE BAGAÇO DE MALTE POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA.....	51
FIGURA 7 - CROMATOGRAMA DO BAGAÇO DE MALTE OBTIDO A 280 nm.....	53
FIGURA 8 - DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO BAGAÇO DE MALTE PELO MÉTODO DE DPPH <sup>•</sup> .....	56
FIGURA 9 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE ATIVIDADE QUELANTE DO ÍON FERROSO.....	56
FIGURA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE ABTS <sup>•+</sup> .....	57
FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DA FABRICAÇÃO DE CERVEJA.....	57
FIGURA 12 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL ABTS <sup>•+</sup> POR UM ANTIOXIDANTE E SUA FORMAÇÃO PELO PERSULFATO DE POTÁSSIO.....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO FÍSICA QUÍMICA DO RESÍDUO ÚMIDO DE CERVEJARIA.....	44
TABELA 2 – COMPOSTOS BIOATIVOS.....	46
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM mg/g DE LIPÍDIOS TOTAIS DE RESÍDUOS DA PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	50
TABELA 4 - PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS ANALISADOS POR CLAE NO BAGAÇO DE MALTE.....	53
TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA O BAGAÇO DE MALTE POR DIFERENTE MÉTODOS .....	58
TABELA 6 – POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO BAGAÇO DE MALTE.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Atividade Antioxidante
ABTS <sup>•+</sup>	Ácido 2,2'-Azinobis 3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfônico
AGMI	Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
AGS	Ácidos Graxos Saturados
<i>Ale</i>	Alta Fermentação
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência
DIC	Detector De Ionização Em Chamas
DPPH <sup>•</sup>	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil
DPR	Desvio Padrão Relativo
DR <sub>C</sub>	Degradação Do Controle
DR <sub>S</sub>	Degradação Da Amostra
EAG	Equivalente De Acido Gálico
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
EMAGs	Ésteres Metílicos De Ácidos Graxos
TE	Elétrons Transferência
TAH	Transferência De Átomo De Hidrogênio
HDL	<i>High Density Lipoproteins</i> (Lipoproteínas De Alta Densidade)
<i>Lager</i>	Baixa Fermentação
MS	Massa Seca
n3	Ácidos Graxos Ômega
n6	Ácidos Graxos Ômega 6
Pi	Padrão Interno
QE	Equivalente A Quercetina
R <sup>2</sup>	Coeficiente De Determinação
<i>Trub</i>	Material Precipitado Após A Etapa De Fervura Na Fabricação De Cerveja
UFC	Unidade Formadora De Colônia
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
1.1 OBJETIVOS .....	15
1.1.1 Objetivo geral .....	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
1.2 JUSTIFICATIVA .....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 CONTEXTO HISTÓRICO.....	17
2.2 PRODUÇÃO DA CERVEJA .....	18
2.2.1 Matéria-prima .....	18
2.2.2 Processo de produção da cerveja .....	19
2.3 BAGAÇO DE MALTE .....	22
2.4 ANTIOXIDANTES .....	25
2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	28
2.6 FLAVONOIDES.....	29
2.7 ANTOCIANINAS .....	29
2.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 MATÉRIA-PRIMA.....	33
3.2.1 Fibras e Minerais.....	33
3.2.2 Composição Físico-química .....	33
3.3 PREPARO DO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE .....	34
3.4 ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS DO RESÍDUO .....	34
3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ANTOCIANINAS .....	35
3.6 ANÁLISE DE FLAVONOIDES.....	35

3.7 DPPH <sup>•</sup> - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	36
3.8 ÍON FERROSO - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	37
3.9 $\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	38
3.10 ABTS <sup>•+</sup> - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	39
3.11 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO BAGAÇO DE MALTE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA (CG).....	40
3.12 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)....	41
3.13 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO .....	42
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA .....	44
4.2 COMPOSTOS BIOATIVOS.....	46
4.3 FLAVONOIDES.....	48
4.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO BAGAÇO DE MALTE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA (CG).....	49
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE .....	52
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	55
4.7 POTENCIAL ANTIBACTERIANO.....	60
REFERÊNCIAS.....	64

## 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida composta por água, malte, lúpulo e levedura, obtida a partir da fermentação natural da cevada, na qual o açúcar existente nos próprios ingredientes é transformado em álcool. Acredita-se, que tenha sido a primeira bebida alcoólica desenvolvida pelo homem, desde o ano 8.000 a.C (CARVALHO *et al.*, 2006).

A cerveja possui uma complexa mistura de compostos fenólicos, que variam entre 150 a 350 mg/L. Deste total, mais de 60% é derivado do malte (CORTACERO-RAMIREZ *et al.*, 2003).

O álcool, em baixas doses e os compostos fenólicos possuem importante função na proteção da agregação plaquetária. O etanol tem efeito direto nas plaquetas, no metabolismo do colesterol HDL e apresenta papel importante na absorção de compostos fenólicos. Desta forma, o consumo moderado de bebidas alcoólicas, em particular o vinho e a cerveja, está associado à diminuição de mortalidades causadas por doenças cardiovasculares (GHISELLI, 2000 e GRONBAEK, 1995).

O Brasil é o 3º maior produtor de cerveja do mundo, com uma média de 13 bilhões de litros ao ano, ultrapassando a produção da Alemanha (11,6 bilhões de L/ano) ficando atrás apenas da China (35 bilhões de L/ano), EUA (25 bilhões de L/ano), no entanto é o 24ª país no ranking de consumo per capita de cerveja, com uma média de 65 L/ano para cada habitante (CERVBRASIL, 2012).

Na produção de cerveja aproximadamente 15 kg de malte e adjunto são consumidos por 100 litros de cerveja produzidos (UNEP,1996).

Os resíduos sólidos na fabricação de cerveja são gerados principalmente na etapa de filtração do mosto, ou seja, os “grãos usados”, que são os resíduos oriundos do aproveitamento do conteúdo dos grãos de malte, constituídos de restos de casca e polpa dos grãos, misturados, em suspensão ou dissolvidos no mosto (UNEP,1996).

Dentro desse contexto, o Brasil, com sua economia fortemente baseada no agronegócio, contribui para a geração de grande quantidade de



resíduos agroindustriais resultantes das atividades de processamento. (ALBUQUERQUE, 2009).

Assim sendo, o desenvolvimento deste trabalho se faz importante para a avaliação e caracterização do resíduo de malte proveniente da produção de cerveja, pois aumenta o interesse de novas pesquisas tecnológicas agregando valor a esse resíduo com o apelo das propriedades funcionais.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Caracterizar o bagaço de malte, com base na quantificação de compostos bioativos e atividade biológica destes compostos presentes no resíduo por diferentes técnicas, avaliação do potencial antioxidante antibacteriano.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente o bagaço de malte;
- Estudar as condições do processo de extração dos compostos fenólicos do bagaço de malte com relação à concentração dos solventes, álcool etílico e água.
- Determinar o teor de fenólicos totais.
- Determinar o conteúdo de flavonoides totais e antocianinas.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos através dos métodos DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), Atividade quelante do íon ferroso,  $\beta$  - caroteno/ ácido linoleico.
- Avaliar o perfil de ácidos graxos presente no resíduo utilizando cromatografia gasosa (CG).

- Determinar o perfil de compostos fenólicos do extrato por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).
- Estudar o potencial antibacteriano do resíduo.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A grande quantidade de subprodutos gerados no processo de fabricação de cerveja, nos leva a considerar a importância de outros reaproveitamentos deste resíduo produzido, além da sua utilização como ração animal, bem como a consequente necessidade de se proceder estudos para conhecer e quantificar seus compostos mais importantes.

Diversos compostos podem estar presentes nesse resíduo, os quais podem, também, apresentar propriedades químicas de interesse. Entre eles estão os compostos fenólicos, os quais apresentam propriedades antioxidantes, e neste sentido, surge uma oportunidade de pesquisa, pois existem poucos trabalhos sobre a atividade antioxidante, perfil de ácidos graxos, identificação de compostos fenólicos e avaliação do potencial antibacteriano do resíduo úmido de cervejaria.

O bagaço de malte é um subproduto desperdiçado ou usado como ração animal, obtido após a elaboração de cerveja e pode apresentar uma boa fonte de compostos funcionais. O desenvolvimento de estudos que caracterizem e permitam a reutilização de resíduos produzidos em grandes quantidades, buscando uma pesquisa com impacto social e ambiental positivos, pode ser uma alternativa para o aproveitamento deste resíduo da indústria cervejeira.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONTEXTO HISTÓRICO

A origem das primeiras bebidas alcoólicas é incerta, porém estima-se que entre as bebidas fermentadas a cerveja seja uma das mais antigas tendo se iniciado por volta de 8.000 a.C. (CARVALHO *et al.*, 2006 e CARVALHO *et al.*, 2007).

Os sumérios e os babilônios foram os primeiros a levar para as gerações posteriores um registro de como se fabricava a bebida em um monumento conhecido como Pedra Azul, que se encontra hoje exposto no Museu do Louvre, em Paris contendo inscrições sobre como se produzia a cerveja. Esses povos dominavam os processos produtivos de mais ou menos vinte tipos de cervejas diferentes. A cerveja logo se popularizou entre os povos antigos e passou a ser produzida em larga escala pelos egípcios (FURIGO *et al.*, 2009).

Há registros de que a cerveja era distribuída aos trabalhadores que ergueram as pirâmides com o objetivo de relaxá-los. Tudo isso comprova que os egípcios, de fato, eram mais sábios do que se imagina (FURIGO *et al.*, 2009).

A palavra “cerveja - beer” provém do latim “bibere” que quer dizer beber. Os imigrantes, colonos primitivos ingleses e holandeses, trouxeram a tecnologia doméstica da fabricação da cerveja para a América, preparando a mesma com milho e lúpulo (AQUARONE *et al.*, 1983; MATAIX, 2004).

No Brasil, a cerveja chegou por volta de 1808, trazida por Dom João VI. Até o século XIX ela era importada e privilégio dos nobres (AMBEV, 2013). Em 1900, já estava estabelecida a indústria cervejeira com 27 cervejarias registradas (AQUARONE *et al.*, 1983)

Segundo a legislação brasileira, receita federal, Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997, art.64 a art.71: “Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água

potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. O malte de cevada usado na elaboração de cerveja e o lúpulo poderão ser substituídos por seus respectivos extratos. Parte do malte de cevada poderá ser substituído por cereais maltados ou não, e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não, os cereais referidos neste artigo são a cevada, o arroz, o trigo, o centeio, o milho, a aveia e o sorgo, todos integrais, em flocos ou a sua parte amilácea”.

O sabor da cerveja é determinado pela matéria, pelo tipo de processo e pela levedura utilizada, além dos compostos durante a fermentação e maturação, que exercem maior impacto (CARVALHO *et al.*, 2007).

## 2.2 PRODUÇÃO DA CERVEJA

### 2.2.1 Matéria-prima

A cerveja é constituída basicamente de água, sendo esta a matéria-prima mais importante na fabricação de cerveja, estima-se que, aproximadamente 10 L de água são consumidos para cada litro de cerveja produzido, por isto, é importante que a fonte utilizada possua água em abundância e que suas características físicas e químicas sejam de qualidade para se obter uma cerveja de boa qualidade. (MADRID, 1996 e REINOLD, 1997).

O cereal mais usado para a fabricação de cerveja é a cevada, apesar de outros cereais poderem também ser utilizados tais como trigo e milho (NAKANO, 2000).

A cevada é uma gramínea pertencente ao gênero *Hordeum*, que é cultivada desde a antiguidade, sendo originária do oriente. Dentre as espécies cultivadas de cevada a chamada "cevada cervejeira", é a mais utilizada para a obtenção do malte utilizado na fabricação de cervejas. A maioria das espécies de cevada possui uma casca cimentada ao grão, que funciona como um

agente filtrante contribuindo no aroma, cor e sabor do mosto, além de proteger o grão de impactos mecânicos sofridos durante o processo de maltagem (EHRHARDT & SASSEN 1995).

O lúpulo é uma planta dióica, o que quer dizer que produz flores masculinas e femininas, porém na fabricação de cerveja utilizam-se apenas as flores femininas, pois são estas que contém a substância amarga “lupulina”, que dá o amargor típico e contribuem para o aroma característico da cerveja. Existem dois tipos de lúpulos fundamentais: os de amargor e os aromáticos. Além das características organolépticas, dadas a cerveja pelo lúpulo, esta planta ainda possui outras funções como evitar a formação de espuma durante a fervura sendo um agente bacteriostático (CERVESIA, 2013).

As leveduras metabolizam eficientemente os constituintes do mosto em etanol e em outros produtos da fermentação a fim de produzir uma cerveja com qualidade e estabilidade satisfatórias (CARVALHO *et al.*, 2006). As mais utilizadas em cervejaria são de duas espécies do gênero *Saccharomyces*: *Saccharomyces cerevisiae* (alta fermentação, tipo *Ale*) e *Saccharomyces uvarum* (baixa fermentação, tipo *Lager*), sendo que a do tipo *Lager* são as mais comuns e mais consumidas (VENTURINI, 2010).

As matérias-primas essenciais para a fabricação da cerveja são: água, malte, levedura e lúpulo. Porém outros componentes denominados adjuntos podem ser utilizados (MATAIX, 2004).

## 2.2.2 Processo de produção da cerveja

Os processos de fabricação se diferem pela fermentação utilizada que pode ser: tradicional (descontínuo) ou contínuo. Independente do tipo, o processo pode ser dividido nas seguintes etapas: moagem do malte, mosturação ou tratamento enzimático do mosto (preparo do mosto), filtração ou decantação do mosto, fervura ou cozimento, tratamento do mosto (remoção do precipitado (*trub*), resfriamento e aeração), fermentação, maturação, filtração do levedo ou clarificação, pasteurização e envase (TSCHOPE, 2001).

O processo cervejeiro é consequentemente um processo de múltiplos estágios envolvendo a conversão biológica de materiais *in natura* em produto final (WALKER, 2000).

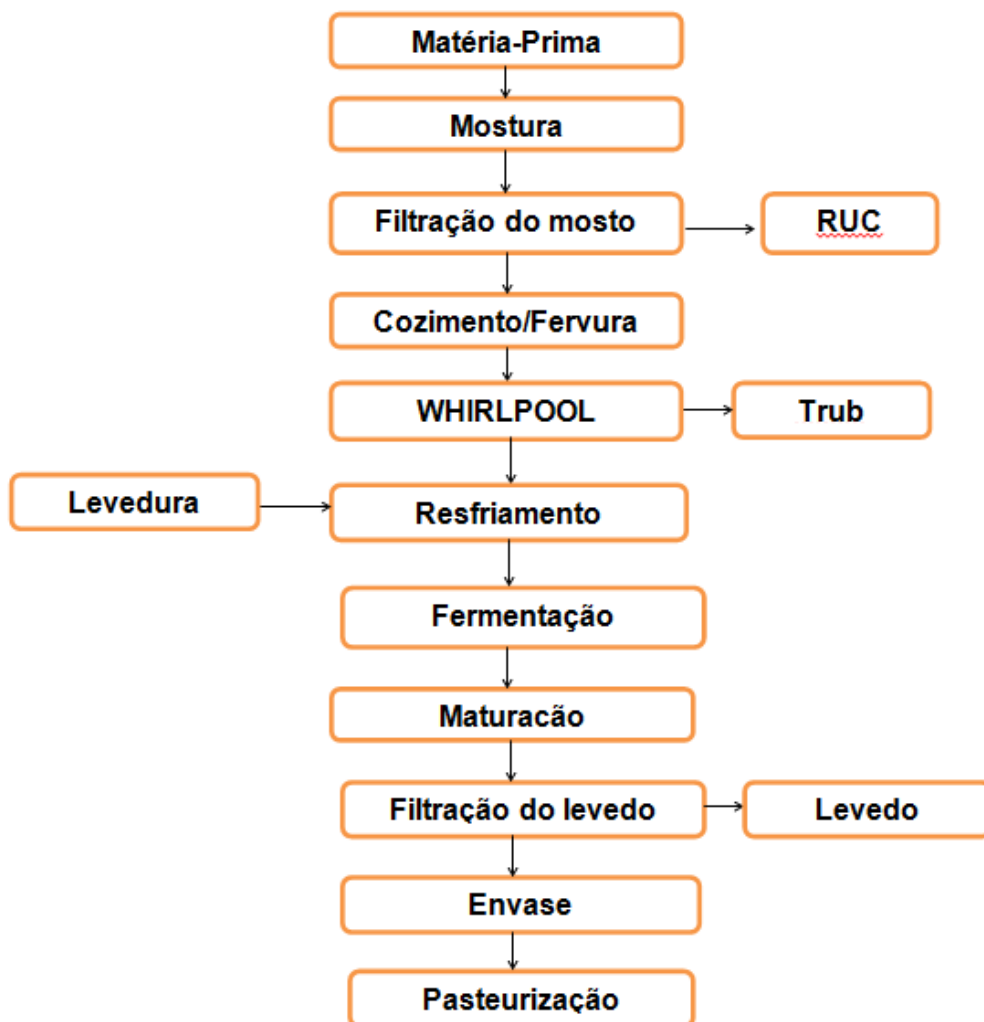


FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA FABRICAÇÃO DE CERVEJA

A moagem do malte tem influência direta sobre a rapidez das transformações físico-químicas, rendimento, a clarificação e a qualidade do produto final. O objetivo é a redução do grão de malte de modo uniforme, pois ocorre o rompimento da casca com exposição e desintegração total da porção interna do grão, o endosperma, promovendo uma melhor atuação enzimática. O malte deve ser moído de forma a quebrar todos os grãos, porém sem fazer muito farelo. Se o malte for moído muito fino irá fazer “farinha” da casca que gerará problemas na filtragem e com taninos. Se o malte for moído muito

grosso os grãos não terão seu conteúdo exposto e conseqüentemente terá de gastar mais malte para conseguir o resultado desejado (VIEIRA, 2009).

A mosturação consiste na mistura do malte moído juntamente com água em temperatura controlada, tem por objetivo solubilizar as substâncias do malte diretamente solúveis em água e, com o auxílio das enzimas, solubilizar as substâncias insolúveis, promovendo a gomificação do amido e posterior hidrólise do mesmo em açúcares fermentescíveis como maltose, glicose e dextrinas (KUNZE, 1997).

A filtração do mosto consiste em separar o mosto do bagaço por decantação e filtragem, ou seja, as cascas do malte decantam e servem como uma camada filtrante do mosto (FURIGO *et al.*, 2009).

É na etapa de fervura que se adiciona o lúpulo de amargor que é rico em taninos, esse age como antimicrobiano e o lúpulo aromático que confere as características sensoriais. Na fervura se assegura a assepticidade, promove-se a precipitação de complexos entre proteínas e polifenóis, a solubilização de componentes do lúpulo, a remoção de compostos que determinam sabores desagradáveis no produto final e a obtenção da concentração desejada de açúcares. As enzimas presentes são inativadas durante a fervura. O material precipitado, conhecido como *trub*, é então removido (CARVALHO *et al.*, 2006).

Após a remoção do *trub*, o mosto é transferido para o fermentador, resfriado à temperatura de aproximadamente 25°C, aerado até a saturação na concentração de oxigênio dissolvido e adicionada a levedura ativada (CARVALHO *et al.*, 2006).

As leveduras de alta fermentação (*A/e*) se proliferam na superfície do mosto e ao final da fermentação sedimentam, produzem cervejas de aromas frutados e florais onde a temperatura ótima de fermentação está no intervalo de 18 – 24 °C. A levedura de baixa fermentação (*Lagers*) é utilizada normalmente na fabricação de cervejas *pilsen*. Estas são produzidas por leveduras que quando misturadas no mosto durante a fermentação, trabalham a temperaturas mais baixas que as das ales, entre 8º e 14º C. Normalmente mais refrescantes e leves, com aromas mais suaves e limpos (FURIGO *et al.*, 2009).

O processo de fermentação da cerveja pode-se dividir em duas etapas diferentes. A primeira, denominada fermentação, trata-se da fase de grande

atividade metabólica da levedura, durante a qual quase todo extrato fermentável (açúcar) é convertido em álcool etílico e gás carbônico. Essa fase dura aproximadamente 7 dias. A segunda etapa, chamada maturação, diz respeito ao período de maturação da cerveja, onde ocorrem reações que acentuam o aroma e sabor e o CO<sub>2</sub> (expulso) faz uma limpeza de compostos e gases de aroma desagradáveis. Esta etapa é conduzida a baixa temperatura, normalmente 0°C, por um período que varia de duas a quatro semanas. Após a fermentação, ocorre a maturação onde o extrato fermentável residual da cerveja continua a ser lentamente fermentado. Mas o processo de maturação continua por um longo tempo, mesmo depois do término da maturação (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

Quando cessa a fermentação, o volume é mantido em repouso por alguns dias ou passa por centrifugação para ocorrer à separação das leveduras no tanque. Normalmente, não se remove todo fermento, pois a cerveja nesta etapa ainda não tem desenvolvido todo seu sabor, e ainda possui algum açúcar disponível para posterior maturação. Assim, este açúcar é fermentado durante a maturação pelo fermento residual (TORNIC, 1986).

Após a maturação, a cerveja contém leveduras, partículas coloidais dos complexos proteínas-polifenóis e outras substâncias insolúveis, formadas devido ao pH existente e as baixas temperaturas utilizadas durante essa etapa. Portanto para se obter um produto límpido é necessária uma clarificação ou filtração do levedo prévia ao engarrafamento da cerveja, que permita remover esse material insolúvel (FURIGO *et al.*, 2009).

Após a etapa de clarificação o produto é pasteurizado e envasados. (FURIGO *et al.*, 2009).

## 2.3 BAGAÇO DE MALTE

O bagaço de malte também chamado de polpa cervejeira, bagaço de malte ou cevada, foram definidos por Clark *et al.*, (1987) como resultante do processo inicial da fabricação de cerveja, destacando-se por ser gerado o ano todo e em grandes quantidades.



A indústria de cerveja no Brasil utiliza o malte de cevada, como matéria prima para a produção de cerveja. Malte é um termo técnico utilizado para definir a matéria-prima resultante da germinação de qualquer cereal sob condições controladas, como por exemplo: malte de cevada malte de trigo, de centeio e de outros cereais.

Para a obtenção do malte, a cevada colhida é limpa e classificada de acordo com o tamanho em peneiras de 2,5, 2,4, 2,2 e 2,0 milímetros de abertura. O grão então passa por um período de dormência de 4-6 semanas, quando ocorre a maltagem, um processo de germinação controlada, que serve para aumentar o teor enzimático dos grãos.

A Maltagem é realizada em três passos: (1) molhagem, (2) germinação e (3) a secagem. Durante a operação de molhagem, os grãos de cevada limpos são colocados em tanques com água entre 5 e 18 °C por aproximadamente 2 dias. A água entra eventualmente no embrião através do micrópilo e o teor de humidade dos grãos atinge entre 42 e 48%. A água de maceração é trocado a cada 6-8 h. Após molhagem, a cevada é transportada para germinação, por rosca sem fim e mantida em contato com uma corrente de ar húmido que flui através do leito de grãos , mantendo a temperatura entre 15 e 21 °C . O passo de germinação promove a síntese e ativação de enzimas na aleurona e endosperma do amido, incluindo amilases, proteases,  $\beta$ -glucanases e outros. A ação dessas enzimas modifica a estrutura do endosperma amiláceo. No final do processo de germinação, que normalmente dura 6 ou 7 dias, o endosperma é inteiramente e uniformemente modificado . A cevada maltada é seca em (secador) a 40-60 °C passando para um teor de umidade de 4-5%, para evitar a contaminação microbiana e para evitar a geração de sabor atípico. O malte seco é armazenado durante 3 ou 4 semanas, para alcançar homogeneidade e equilíbrio (TSCHOPE , 2001; VENTURINI FILHO E CEREDA, 2001; KUNZE, 1997; CABRAL FILHO, 1999).

Para a produção de cerveja o grão maltado é prensado e adicionado em água, formando o mosto de cerveja. Este processo promove a liquefação e a hidrólise do amido a açúcares, obtendo 65% de extração dos sólidos totais do malte. A parte sólida é separada, constituindo o bagaço de malte e a líquida segue o processo de fabricação de cerveja, sendo bagaço de malte um

subproduto obtido através do processo de fabricação da cerveja. Este resíduo pode ser descartado ou comercializado para ração animal, sob a forma úmida (em torno de 14% MS), prensada (30% MS) ou seca (83- 92% MS). A forma úmida, embora de transporte mais caro, representa um custo menor para a indústria e por isso é a mais comumente comercializada (CABRAL FILHO, 1999; CLARK *et al.*, 1987).

A produção de grãos de cevada em 2012 no Brasil foi de 299,558 mil toneladas (LSPA/IBGE, 2013). Segundo Brochier & Carvalho (2009) a partir de uma avaliação em indústria cervejeira, observaram que a quantidade de bagaço de malte foi de 32,02% a mais que a quantidade de cevada seca utilizada como matéria prima, ou seja, para cada 100 Kg de matéria prima utilizada foi gerado 132,02 Kg de resíduo demonstrando que a indústria cervejeira tem um grande potencial de geração de resíduos, pois esse resíduo aumenta após o processo de fabricação da cerveja devido a sua umidade.

De acordo com Aliyu & Bala (2011), para cada 100 litros de cerveja, 20 kg de bagaço de malte são obtidos. No Brasil em 2012, a produção de cerveja foi de 13,74 bilhões de litros. Esta produção gera em torno 2,74 bilhões de kg de bagaço de malte. A grande oferta desse subproduto ao longo do ano no Brasil viabiliza a sua utilização em pesquisas (GERON *et al.*, 2007; SICOBE, 2013).

O valor nutricional do bagaço de malte está diretamente relacionado ao processo e ao tipo de cerveja fabricada. Fatores como a origem dos grãos de cevada e a adição ou não de outros cereais, como milho, trigo, aveia e arroz são também determinantes na composição química destes subprodutos (ZDUNCZYK *et al.*, 2006).

O bagaço de malte é considerado um concentrado proteico na classificação internacional de alimentos, pois apresentam teores de aproximadamente 70% de fibras, 20% de proteína, 1,2% de mono e diácidos fenólicos e é fonte de vitaminas do complexo B, portanto, tem um alto valor nutritivo (ARAÚJO *et al.*, 2009; MUSSATTO *et al.*, 2006). O grão de cevada maltada ainda possui elevados teores de antioxidantes, comparado a outros cereais, contém compostos bioativos como fitatos, vitamina E (incluindo tocofenóis e tocotrienóis) e compostos fenólicos (ZDUNCZYK *et al.*, 2006).

## 2.4 ANTIOXIDANTES

Segundo Damodaram *et al.*, (2010) e Huang *et al.*, (2005) não existe uma definição uniforme para antioxidante, pois existem diversos mecanismos químicos pelos quais a oxidação pode ser inibida, sendo alguns desses pelo mecanismo de cinética química da reação de oxirredução entre o oxidante e o antioxidante e as reações de transferência de elétrons, porém os tecidos biológicos a partir dos quais os alimentos são obtidos contêm muitos sistemas antioxidantes endógenos.

Antioxidantes podem ser definidos como compostos, naturais ou sintéticos que quando presentes em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato, além disso, apresentam elevada estabilidade oxidativa e têm propriedade de prevenir a oxidação de outras substâncias como proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (MOREIRA & MANCINI-FILHO, 2003; HALLIWELL, 2002).

Portanto os antioxidantes são geralmente classificados como “inibidores da oxidação lipídica e conseqüentemente da deterioração de alimentos”. No trato-gastrointestinal humano, bem como nos tecidos corporais o dano gerado pelo desequilíbrio entre antioxidantes e radicais livres, é tão importante quanto na oxidação lipídica, sendo que a lesão desta molécula pode ser considerada um dos maiores riscos para o desenvolvimento de doenças como câncer e infarto do miocárdio (HALLIWELL, 2002).

Os antioxidantes podem ser classificados em produtos que atuam na formação do  $^1\text{O}_2$  (oxigênio singlete) ou que reagem com o  $^1\text{O}_2$ , onde agem como doadores de prótons, produtos que agem de forma competitiva de cadeia ou que atuam sobre os peróxidos, decompondo-os, de forma a produzirem compostos que não mais participam da reação em cadeia de radicais livres. Esses antioxidantes são encontrados nos compostos fenólicos, aminoácidos, tocoferóis e carotenóides. Entre eles são também caracterizados os antioxidantes sintéticos, as vitaminas A e E, (DONNELLI & ROBINSON, 1995; STEINBERG, BEARDEN & KEEN, 2003).

As plantas como frutas, vegetais e cereais, contêm diversos compostos fenólicos como fenólicos simples, ácidos fenólicos, antocianinas, derivados de ácidos cinâmico e flavonoides sendo que os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, principalmente a classe dos flavonoides. Todas as classes de fenólicos apresentam os requisitos estruturais de sequestradores de radicais livres (SRLs), embora suas atividades variem muito. Os fatores que influenciam na atividade de SRL fenólicos vegetais são posição e grau de hidroxilação, polaridade, solubilidade, potencial de redução, estabilidade do fenólico a operação do processamento do alimento e estabilidade do radical fenólico. Os níveis de fenólicos em plantas podem variar em função da maturidade da planta, tipo de tecido, das condições de crescimento, da idade pós-colheita e das condições de armazenamento (DAMODARAM *et al.*, 2010).

As evidências epidemiológicas sobre o papel de alimentos antioxidantes na prevenção de algumas doenças vêm crescendo e têm conduzido ao desenvolvimento de numerosos métodos para determinar a capacidade antioxidante. Muitos métodos têm sido utilizados para avaliar e comparar a atividade antioxidante de produtos de origem vegetal devido à complexidade dos substratos analisados (KAUR & KAPOOR, 2001; SZABO *et al.*, 2007).

A capacidade antioxidante é avaliada principalmente através de testes químicos e, mais recentemente, através de um teste antioxidante celular. A atividade antioxidante utilizando métodos químicos é avaliada em primeiro lugar por meio de: (I) métodos de transferência de átomo de hidrogênio (TAH) ou (II) métodos transferência de elétrons (TE) (HAMINIUK *et al.*, 2012).

O método de ABTS<sup>•+</sup> para determinar a atividade antioxidante ocorre através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>), que pode ser gerado através de reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 2). Através desta metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza tanto hidrofílica como lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

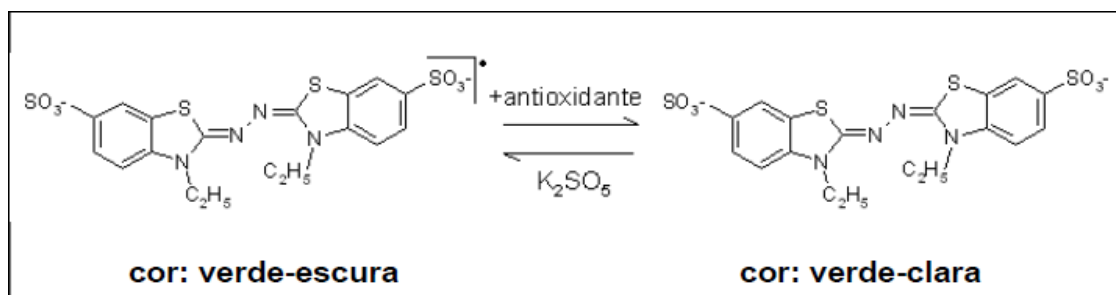


FIGURA 2 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL ABTS<sup>•+</sup> POR UM ANTIOXIDANTE E SUA FORMAÇÃO PELO PERSULFATO DE POTÁSSIO

FONTE: KUSKOSKI *et al.*, 2005

A metodologia  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico foi desenvolvida por Marco (1968), modificado por Miller (1971) e utiliza o ácido linoléico, monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e o  $\beta$ -caroteno. É uma análise espectrofotométrica que se baseia na oxidação (descoloração) do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico (SILVA *et al.*, 1999), ou seja, este método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

O método DPPH<sup>•</sup> baseia-se na captura do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm, onde a amostra passa de uma cor violeta escura para violeta claro, podendo até chegar a um leve amarelo (Figura 3) (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

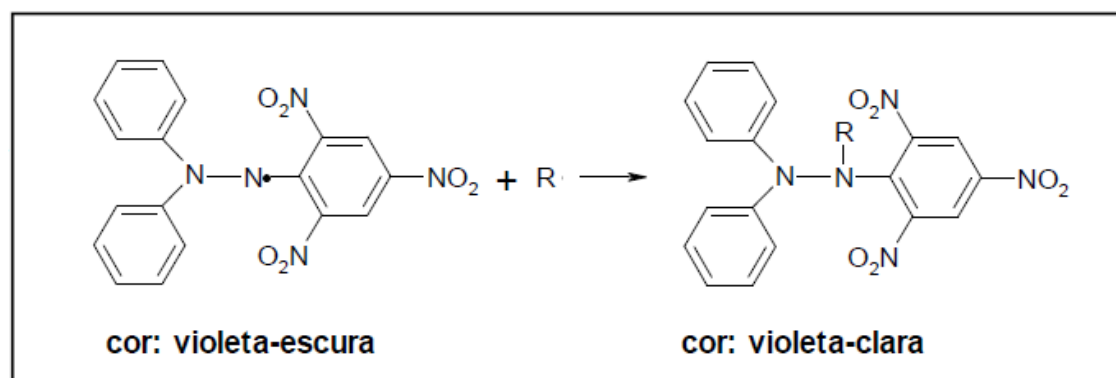


FIGURA 3 - ESTABILIZAÇÃO DO RADICAL LIVRE DPPH<sup>•</sup>

FONTE: BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995

Um método também muito utilizado para determinar o potencial antioxidante é o de atividade quelante do íon ferroso. Este teste avalia a inibição da geração do radical  $\text{OH}^\cdot$  pela ligação com o metal de transição Fe. Isso pode ocorrer por dois mecanismos: um deles é que a ligação do antioxidante com íons metal pode alterar seu potencial de oxirredução e/ ou outro é a capacidade deste mesmo metal em participar da formação do radical  $\text{OH}^\cdot$  (ARUOMA *et al.*, 1987).

Portanto atividade antioxidante pode ser avaliada por diferentes experimentos e diferentes mecanismos de ação (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURACALIXTO, 2006).

## 2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

Em alimentos os compostos fenólicos são uma das substâncias de atividade biológica mais estudada. Em sua estrutura possuem no mínimo um anel aromático, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais abrangendo cerca de 8000 compostos com diferentes estruturas químicas. São substâncias que podem ser encontradas amplamente no reino vegetal e em seus derivados (verduras, legumes, cereais, sucos de frutas, vinho, chá, café, chocolate e cerveja), pois são produzidas naturalmente pelas plantas. Possuem influência direta sobre parâmetros sensoriais, tais como cor e adstringência (FERNANDEZ-PANCHON *et al.*, 2008; KUSKOSKI *et al.*, 2005; STALIKAS, 2007).

Os compostos fenólicos conferem propriedades antioxidantes não apenas para os alimentos, como para o organismo, por isso são indicados na prevenção de algumas patologias, que envolvem a participação dos radicais livres dentre elas: câncer, doenças cardiovasculares, catarata, entre outras doenças. Esses compostos atuam como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, inibidores da lipoxigenase e ainda podem agir como quelantes de metais (PALLI, 2004).

## 2.6 FLAVONOIDES

Os flavonoides apresentam-se amplamente nas plantas, pois quase todos os tecidos das plantas são capazes de sintetiza-los. Existe uma enorme variedade de flavonoides e são classificados em seis grupos pela diferença da sua estrutura: flavonas, flavanonas, flavonolóis, isoflavonas e flavanóis (catequinas) (DAMODARAM *et al.*, 2010). Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e chás (VAN ACQUIRE, 1996).

São atribuídas diversas funções aos flavonoides quando nas plantas. Podendo ser citadas a proteção contra a incidência de raios UV, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alopática e inibição enzimática (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Já *in vitro* os flavonoides têm sido de interesse devido aos seus efeitos biológicos tais como inibição de radicais livres, modulação da atividade enzimática e inibição de proliferação celular, também possui utilidade potencial como antibióticos, antialérgicos, agentes antidiarreicos, antiúlcera e anti-inflamatória (ROSS & KASUME, 2002).

## 2.7 ANTOCIANINAS

As antocianinas são pigmentos vegetais encontrados principalmente em flores, frutos e folhas. Entre as antocianinas conhecidas as mais comuns em alimentos derivam das antocianidinas ligadas a açúcares (BOBBIO & BOBBIO, 2001). São conhecidos vinte tipos de antocianidinas que ocorrem naturalmente, porém apenas seis são mais frequentes: pelargonidina, cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina e petunidina. Elas se diferenciam devido a vários fatores: número de grupos hidroxila, esterificados na molécula, grau de metoxilação desses grupos, natureza, número e posição de glicosilação, natureza e número de ácidos alifáticos e aromáticos, ligados aos resíduos glicosídeos (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). As diferentes estruturas podem ser vistas na Figura 4.

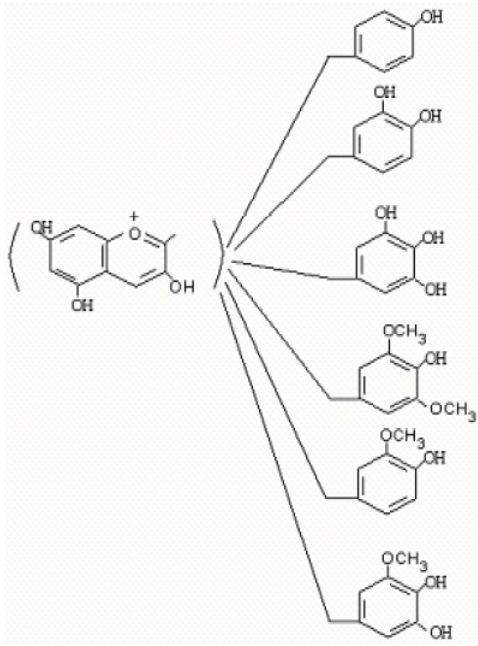



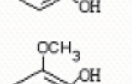


Estrutura o cátion flavilium	Estrutura anel B	Nome	Glicosídeo encontrado em:
		Perlargonidina	Morango, amora vermelha, bananeira
		Cianidina	Jabuticaba, figo, cereja, uva, cacau, ameixa, jambolão, amora
		Delfinidina	Berinjela, romã e maracujá.
		Malvidina	Uva, feijão
		Peonidina	Uva, cereja
		Petunidina	Frutas diversas, petúnias

FIGURA 4 - ESTRUTURA, NOME E LOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS ANTOCIANINAS  
 FONTE: BOBBIO & BOBBIO, 2001

Segundo Ribeiro & Seravalli (2004) as antocianinas são pigmentos instáveis, porém em condições ácidas apresentam estabilidade. A cor do pigmento e a sua estabilidade são muito influenciadas pelos substituintes da aglicona. A sua degradação pode ocorrer durante a extração do vegetal, processamento e estocagem podendo ser influenciada por diversos fatores dentre eles: pH, temperatura, enzimas, ácido ascórbico, oxigênio, dióxido de enxofre e íons metálicos.

As antocianinas possuem capacidade antioxidante, ou seja, retardam o envelhecimento, prolongam a vida das células, aumentam as defesas imunológicas, propiciam uma melhor circulação sanguínea, pois protegem o organismo contra o acúmulo de lipídeos nas artérias. Esta funcionalidade se dá devido à deficiência de elétrons do núcleo flavílio e à presença de hidroxilas livres, assim como de outras estruturas químicas na molécula, podendo ocorrer variações quanto à intensidade da atividade antioxidante (CRUZ, 2008).



## 2.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As bactérias são organismos simples encontrados em sua maioria em ambientes naturais. São células esféricas ou em forma de bastonetes de vários tamanhos, podendo alcançar micrômetros linearmente. A célula bacteriana apresenta várias estruturas, algumas das quais estão presentes apenas em determinadas espécies, enquanto outras são essenciais, e, assim encontradas em todas as bactérias (MIMS *et al.*, 1999 ).

As bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com a constituição da parede celular: Gram-negativas e Gram-positivas. Esses dois grupos se diferem principalmente por suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. Essas principais diferenças podem ser reveladas pela coloração de Gram que estão relacionadas a presença de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas e de uma grossa camada de peptidoglicano nas bactérias Gram-positivas (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, patogênica ao ser humano e a outros mamíferos, bastante comum e causador de diversos tipos de infecções. A gravidade da infecção vai desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância, até infecções graves potencialmente fatais (TRABULSI *et al.*, 1999).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, cujos sintomas dependem do local da infecção, do tipo da cepa e do sítio de ação. Suas cepas são classificadas pelas suas propriedades de virulência, e cada grupo provoca diarreia através de um mecanismo diferente (TRABULSI *et al.*, 1999; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

A *Salmonella typhimurium* é uma bactéria Gram-negativa, comumente encontrada no homem e causa gastroenterite que tem início na mucosa intestinal. A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com o tipo sorológico da bactéria, idade e condições de saúde do hospedeiro, ou seja, se o hospedeiro for um adulto normal ocorre apenas uma enterocolite que evolui sem complicações e desaparece dentro de uma semana ou menos. Entretanto,

se o hospedeiro é uma criança a infecção pode evoluir de maneira diferente e pode ser grave (TRABULSI *et al.*, 1999).

As bactérias têm a habilidade genética de adquirir resistência às drogas utilizadas como agentes antibióticos. O problema dos microrganismos resistentes está crescendo, e a perspectiva para o uso de antibióticos diminuindo. Por isso, medidas devem ser tomadas para minimizar esse problema. Por exemplo, ampliar pesquisas para melhor entender o mecanismo genético de resistência e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Das 400.000 a 500.000 espécies de plantas existentes no mundo, somente um pequeno percentual é estudado em suas propriedades fitoquímicas e, menor ainda, é a parcela destinada à investigação da atividade antimicrobiana (MICHIELIN, 2009).

Os agentes antimicrobianos podem ser classificados da seguinte forma: origem (naturais, sintéticos ou semi-sintéticos), efeito antimicrobiano (bacteriostáticos ou bactericidas), espectro de atividade (amplo, intermediário e reduzido) e mecanismo de ação (inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade celular, ou inibição da síntese de DNA ou RNA), sendo comum a classificação dos antimicrobianos pela estrutura química (VALGAS, 2002).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATÉRIA-PRIMA

O resíduo da produção de cerveja *Pilsen* puro malte, utilizado neste trabalho, foi obtido a partir de um único lote e após a etapa de filtração do mosto. O bagaço de malte foi doado pela Micro-Cervejaria Bier Hoff (Curitiba, Paraná).

O resíduo foi seco em estufa de circulação de ar (Marconi MA 035) a 50 °C por 24 horas e em seguida triturado em moinho de facas e armazenado em embalagem de polietileno a vácuo, ao abrigo da luz e a -20 °C, até a realização dos experimentos.

#### 3.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO RESÍDUO

##### 3.2.1 Fibras e Minerais

As análises de fibra bruta, fibra alimentar e minerais, tais como cálcio, ferro, fósforo, manganês, potássio e zinco foram realizadas no CEPPA (Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos) da UFPR.

##### 3.2.2 Composição Físico-química

Foram realizadas as seguintes análises de composição físico-química: pH com leitura direta no pHmetro; determinação de umidade por dessecação e diferença de massa; acidez titulável determinada pela titulação com solução de 0,1M de NaOH e auxílio de pHmetro pois o resíduo tem uma coloração turva; cinzas determinada por diferença de massa; proteínas utilizando a metodologia

de Kjeldahl, segundo as seguintes etapas: digestão, destilação e titulação e teor de lipídeos extraído continuamente por 6 horas em aparelho Soxhlet com éter de petróleo, determinada por diferença de massa (IAL, 2008).

### 3.3 PREPARO DO EXTRATO DE BAGAÇO DE MALTE

Uma amostra de 2 g do resíduo seco foi misturada (suspensa) em 40 mL de uma solução extratora com diferentes concentrações de etanol e água. Cinco concentrações de solução extratora foram testadas 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, etanol e água respectivamente, para determinar a extração máxima de compostos fenólicos, sendo todas realizadas em triplicata. A extração foi realizada em *shaker* (Tecnal/TEC-420 incubadora) por 24 horas a 25°C e 100 rpm. As amostras foram centrifugadas por 25 minutos e 5000 rpm, o sobrenadante retirado e filtrado em papel filtro e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração, por no máximo 7 dias.

### 3.4 ANÁLISE DE FENÓLICOS TOTAIS DO RESÍDUO

Os compostos fenólicos totais presentes no resíduo foram determinados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (ROSSI JUNIOR; SINGLETON, 1965). Em um tubo de ensaio misturou-se 150 µL da amostra, 7500 µL de água destilada e 750 µL de reagente Folin-Ciocalteu, depois de 3 minutos adicionou-se 2250 µL de carbonato de sódio 15%, 4350 µL de água destilada e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Pró-análise UV-1600) a 765 nm após 2 horas ao abrigo da luz. A curva padrão foi realizada com ácido gálico, nas concentrações de 0,05, 0,25, 0,25, 0,65, 0,85, 1,05 (mg/mL), os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico (Sigma-Aldrich, 99% de pureza) por 100g de peso seco de amostra.

### 3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ANTOCIANINAS

Para a determinação do teor de antocianinas utilizou-se o método do pH diferencial descrito por Giusti & Wrolstad (2001). Esse método exige a preparação de duas soluções tampão, cloreto de potássio (KCl) a 0,025 mol/L em pH = 1,0 e acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) a 0,4 mol/L em pH= 4,5. As amostras foram diluídas na proporção 1:5 (600 µL de amostra para 2400 µL de solução tampão), em um tubo de ensaio e para o branco utilizou-se água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Pró-análise UV-1600), em 510 nm e 700 nm. Para os cálculos foi usada a Equação 1 e para a determinação de concentração de pigmentos de antocianinas monomérica (MA), a Equação 2.

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 1,0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH } 4,5} \quad (1)$$

$$MA = \frac{A \times M \times DF \times 1000}{\epsilon \times \lambda} \quad (2)$$

onde:

M= 449,2 g/mol (massa molar da cianidina-3 glucosídeo)

DF= Fator de diluição

$\epsilon$ = 26900 L<sup>-1</sup>mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Absortividade molar)

$\lambda$ = 1 cm (comprimento caminho óptico da cubeta)

### 3.6 ANÁLISE DE FLAVONOIDES

A análise de flavonoides no resíduo foi realizada segundo a metodologia de Chang *et al.*, (2002).

Uma alíquota de 500 µL de solução da amostra foi misturada com 1,5 mL de etanol 95% e subsequentemente adicionou-se 0,1 mL de uma solução de AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (10%), 0,1 mL de acetato de potássio (KCH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>) 1 M e 2,8 mL

de água destilada. Após 30 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Pró-análise UV-1600) imediatamente a 415 nm contra um branco preparado substituindo a mesma quantidade de amostra por água destilada (CHANG *et al.*, 2002). A curva padrão foi elaborada com quercetina (sigma-aldrich, 98% de pureza), nas concentrações de 4, 8, 12, 20, 24 (mg/L), os resultados expressos em miligramas de quercetina em 100g de peso seco da amostra.

### 3.7 DPPH<sup>•</sup> - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A análise foi realizada de acordo com Mensor *et al.*, (2001) com adaptações. Foram utilizadas cinco concentrações diferentes do extrato (2, 4, 6, 8, 10 mg/mL de solução em metanol). Os valores de EC<sub>50</sub> (concentração efetiva) foram calculados por regressão linear onde a abscissa representa a concentração de extratos testados e a ordenada a porcentagem média de atividade antioxidante realizada em triplicata (SIM & SIL, 2008).

A solução de DPPH<sup>•</sup> (0,3 mmol/L) foi preparada utilizando 0,012 g de DPPH<sup>•</sup> suspensos em 100 mL de metanol.

Para o preparo das amostras, foi utilizada uma alíquota de 2,5 mL de extrato da amostra com 1 mL de solução DPPH<sup>•</sup>. Para o branco a solução de DPPH<sup>•</sup> foi substituída por 1 mL do mesmo solvente utilizado na extração (cada amostra e diluição tem seu branco para ser utilizado na equação final) e para o controle negativo a amostra foi substituída por 2,5 mL do mesmo solvente utilizado na extração. Em seguida deixadas ao abrigo da luz por 30 minutos e a absorbância medida em espectrofotômetro (Pró-análise UV-1600) a 518 nm e convertida em porcentagem da atividade antioxidante (% AA) utilizando a Equação 3.

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (3)$$

onde

AA (%) = Atividade antioxidante

$Abs_{amostra}$  = Absorbância da amostra

$Abs_{branco}$  = Absorbância do controle em branco

$Abs_{controle}$  = Absorbância do controle negativo.

### 3.8 ÍON FERROSO - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A análise foi realizada segundo Senevirathne *et al.*, (2006) com algumas modificações, sendo que todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Uma amostra de 700 µL do extrato em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50 mg/mL) foi misturada em 700 µL de água destilada, 175 µL de  $FeCl_2$  (0,5 mmol/L), agitada e absorbância (A1) foi medida a 550 nm. Após a leitura da A1, foram adicionados nos tubos 175 µL de Ferrozina (0,5 mmol/L), iniciando a reação. A mistura foi vigorosamente agitada por 1 minuto e foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos quando a absorbância (A 2) foi medida a 550 nm em espectrofotômetro. Tanto para o branco quanto para o controle negativo utiliza-se água destilada e para o controle positivo EDTA. Os valores foram expressos pelo cálculo do  $EC_{50}$ . A atividade quelante foi dada a partir da Equação 4.

$$\text{Atividade quelante do íon ferroso (\%)} = \left\{ \frac{1 - (A_{2am} - A_{1am})}{(A_{2cont} - A_{1cont})} \times 100 \right\} \quad (4)$$

onde:

A1 am: Absorbância 1 da amostra

A2 am: Absorbância 2 da amostra

A1 cont: Absorbância 1 do controle

A2 cont: Absorbância 2 do controle

### 3.9 $\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do extrato foi avaliada pelo sistema  $\beta$ -caroteno /Ácido linoleico de acordo com a metodologia de Emmons *et al.*, (1999) com algumas modificações, em triplicata do controle e das amostras.

Foi pesado 5 mg de beta caroteno e dissolvido em 100 mL clorofórmio. Na sequência foi retirada uma alíquota de 6 mL de solução clorofórmio/  $\beta$ -caroteno e adicionado 80 mg de ácido linoleico e 800 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi retirado com a utilização de rota-evaporador e o resíduo obtido foi redissolvido em 200 mL de água aerada e agitado vigorosamente até formar uma solução translúcida. A alíquota de 3,0 mL da emulsão de  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico foi misturada com 50  $\mu$ L dos extratos em diferentes concentrações (5, 15, 25, 35, 50 mg/mL), e incubados em banho-maria à 50°C. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro a 470 nm no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas. Para amostras controles foi utilizada a solução extratora (álcool etílico 20%) no lugar do extrato do resíduo. A atividade antioxidante (AA) foi calculada utilizando,  $DR_C$  (degradação do controle)  $\ln(a/b)/120$ ,  $DR_S$  (degradação da amostra)  $\ln(a/b)/120$ , onde  $a$  é absorbância inicial no tempo 0 e  $b$  é a absorbância no tempo 120 min. A atividade antioxidante (AA) foi expressa como percentual de



inibição relativa comparada ao controle depois de 120 minutos usando a Equação 5. Os valores foram expressos pelo cálculo do  $EC_{50}$ .

$$AA = 100 (DR_C - DR_S)/DR_C \quad (5)$$

onde:

AA (%)= Atividade antioxidante

DR<sub>C</sub>= Taxa de degradação do controle

DR<sub>S</sub>= Taxa de degradação do extrato

### 3.10 ABTS<sup>•+</sup> - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O teste de atividade antioxidante pelo método de ABTS<sup>•+</sup> (ácido 2,2'-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) foi realizado baseado na metodologia descrita pela Thaipong *et al.*, (2006). O radical ABTS<sup>•+</sup> formado pela reação de duas soluções estoque, 7,4 mmol/L de ABTS<sup>•+</sup> com 2,6 mmol/L de persulfato de potássio ambas em água destilada, a mistura em quantidades iguais foi incubada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por 12 horas.

Depois de formado o radical a solução foi diluída pela mistura de 1 mL de solução de ABTS<sup>•+</sup> com 60 mL de metanol para se obter uma absorbância de 1,1 a 734 nm. A partir do extrato de (20:80) etanol e água do resíduo, foram preparadas cinco diluições (10, 20, 30, 40, 50 mg/mL) em triplicata.

Em ambiente escuro, um volume de 2,85 mL da solução de radical ABTS<sup>•+</sup> foi acrescentado a 150 µL de cada diluição dos extratos. As absorbâncias foram lidas após 2 horas em espectrofotômetro à 734nm, para o controle negativo foi utilizada água no lugar do extrato. As absorbâncias foram convertidas em porcentagem da atividade antioxidante (%AA) utilizando a Equação 3. Os valores foram expressos pelo cálculo do  $EC_{50}$ .

### 3.11 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO BAGAÇO DE MALTE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

A extração de lipídeos foi realizada pelo método de Bligh & Dyer (1959), usando clorofórmio: metanol: água nas razões de 1:2:0,8 (na primeira etapa) e de 2: 2: 1 (na etapa final).

A esterificação foi realizada segundo método descrito em Hartman & Lago (1972). Em um tubo de ensaio com tampa foram pesados de 20-30 mg da amostra, para extração dos ésteres de ácidos graxos (EMAGs) do resíduo. Foram adicionados 500 µL de padrão interno (1 mg/mL (23;0)), secado em fluxo de N<sub>2</sub> suave e girando o tubo, adicionando-se 4,0 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol a mistura foi agitada por 30 segundos, levada para aquecimento no banho-maria em ebulição por 5 minutos e resfriada em água corrente.

Em seguida, foram adicionados 5,0 mL do reagente de esterificação (preparado a partir da mistura de 2,0 g de cloreto de amônio, 60,0 mL de metanol e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, aquecida por aproximadamente 15 minutos), a mistura foi agitada por 30 segundos, aquecida no banho-maria em ebulição por mais 5 minutos e resfriada em água corrente. Foram adicionados 4,0 mL de NaCl saturado e agitado por 30 segundos, em seguida misturando-se 2,0 mL de iso-octano agitou-se por 30 segundos. A mistura foi mantida em repouso na geladeira por 24 horas, no dia seguinte foi recolhido o sobrenadante, ou seja, os EMAGs esterificados.

Os ácidos graxos foram identificados e quantificados por separação em cromatógrafo a gás Finnigan, modelo 9001 (EUA) acoplado com detector de ionização em chamas (DIC) com coluna capilar de sílica fundida SGE BPX70 (60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, e 0,25 µ de filme de cianopropil polifenileno-siloxano).

As temperaturas do detector e injetor foram de 255 e 250°C, respectivamente. A temperatura da coluna de 185°C por 10 min, programada a 4°C min<sup>-1</sup> até 240°C e mantida nesta temperatura por mais 1 min. O tempo total da análise foi de 25 min e 15 s. O fluxo de H<sub>2</sub> (gás de arraste) de 1,2 mL/min, de N<sub>2</sub> de 30,0 mL/min. Para o detector de ionização em chama foram utilizados

35,0 e 350,0 mL/min de H<sub>2</sub> e de ar sintético, respectivamente. O volume injetado foi de 1,0 µL com divisão de amostra (*split*) de 1:80. As áreas correspondentes aos picos dos cromatogramas foram obtidas por integração com o *software* Clarity Lite (Data Apex, versão 2.7.03.498, República Tcheca). Os EMAGs foram identificados por comparação pelo tempo de retenção de padrões de EMAGs (Supelco). Para a determinação dos ácidos graxos foi realizada a diferença da área dos picos. Ambos os fatores são obtidos baseando-se em comparações entre os EMAGs e um padrão interno (Pi).

A quantificação foi determinada em triplicatas, utilizando mistura de EMAGs (Supelco) incluindo os ésteres dos ácidos: mirístico (14:0), palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (cis) (18:1n-9), oleico (trans) (18:1(t)), linoleico (cis) (18:2n-6), linoleico (trans) (18:2(t)) alfa-linolênico (18:3n-3), araquídico (20:0), behênico (22:0), com quantidade conhecida de padrão interno (Pi) tricosanoato de metila (23:0Me) e, a partir das áreas percentuais e massas dos EMAGs e do Pi (VISENTAINER & FRANCO, 2006).

### 3.12 ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para a identificação e quantificação de compostos fenólicos foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com um ultravioleta-visível de detecção díodos (HPLC-DAD/UV-vis), um sistema Dionex 3000 de CLAE (Dionex, Idstein, Alemanha) equipado com uma bomba Ultimate 3000, coluna de compartimento de amostra Ultimate 3000, detector de fotodiodo Ultimate 3000 e *software* Chromeleon para qualificação e quantificação dos compostos fenólicos.

Foi utilizado no experimento a fase reversa Acclaim® 120, coluna C18 de 5 µm 120 Å (4,6 mm x 250 mm). A coluna foi mantida a 40 °C durante toda a análise e a detecção realizada em três comprimentos de onda (280, 300 e 370 nm). Ácidos fenólicos e flavonóis são normalmente detectados a comprimentos de onda entre 210 e 320 nm. O volume de injeção foi de 10 µL (Maisuthisakul e Gordon 2012). A fase móvel (A) consistiu-se de água

acidificada com ácido fosfórico a 1% e metanol (B). O gradiente de solvente foi como se segue: 0-15% de B em 2 min, 15-25% de B em 5 min, 25-30% de B em 10 min, 30-35% de B em 15 min, 35-50% de B em 25 min, 50-60% de B em 30 min, 60-80% de B em 35 min, 80-100% de B em 45 min, seguida de lavagem e recondicionamento da coluna). A taxa de fluxo foi de 1 mL min<sup>-1</sup>, e os ensaios foram monitorizados a 280, 300, e 370 nm (KELEBEK & SELLI, 2012).

Os seguintes padrões foram utilizados neste estudo: ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, p-cumárico, ácido ferúlico) e flavonoides (rutina, miricetina, quercetina e caempferol). As soluções de todos os padrões foram preparadas em metanol e as curvas de calibração foram obtidas a partir de injeções em duplicata de cinco concentrações. Para a análise por CLAE, os compostos fenólicos foram identificados comparando seus tempos de retenção com os de padrões puros (GRANATO *et al.*, 2011).

### 3.13 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO

A avaliação do potencial antibacteriano foi realizado pelo método de difusão em discos, conforme Bauer *et al.*, (1966) com algumas modificações. Foram utilizadas as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, provenientes do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Campo Mourão. As bactérias foram incubadas em caldo nutriente a 37 °C por 24 horas. Padronizou-se o inóculo de bactérias, comparando-o com o tubo 5 da escala de McFarland (0,5mL de cloreto de bário a 1,0% + 9,5 mL de ácido sulfúrico a 1,0%) por meio da verificação das absorbâncias em 625nm, obtendo-se 1,5 x 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

As bactérias inoculadas a 35 °C por 48 horas em caldo nutriente, foram semeadas em placas de Petri com auxílio de swab no meio ágar Miller Hinton. Após o tempo de incubação, os discos impregnados com 15 µL do material testado (0,01, 0,1, 1 e 50 mg/mL de álcool etílico 20%), foram depositados

sobre o meio com as bactérias. Os discos foram aplicados em cada quadrante das placas contendo as respectivas bactérias. O experimento foi realizado em triplicata para cada cultura bacteriana. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em estufa microbiológica. A leitura do tamanho dos halos foi medida com auxílio de paquímetro.

O antibiótico cloridrato de tetraciclina (50 mg/mL) foi utilizado como controle positivo e o solvente do material testado (álcool etílico 20%) como controle negativo.

### 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises os dados foram apresentados como médias e o desvio padrão para três repetições. A análise estatística dos dados experimentais foi realizada através da análise de variância ANOVA e do teste de comparação de média de Tukey a um nível de significância de 5%. Para tal análise o *software* Statistica 7.0 foi utilizado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A composição físico-química do bagaço de malte após o processo de secagem e moagem pode ser visualizada na Tabela 1.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA DO BAGAÇO DE MALTE.

Análises	Composição
Proteína *	18,50±0,12
Umidade *	6,32±0,05
Lipídios *	6,41±0,02
Cinzas *	3,23±0,05
Fibra alimentar *	43,69±0,00
Fibra bruta *	12,50±0,10
Acidez *	8,03±0,00
pH	5,93±0,05
Cálcio **	81,60±0,07
Ferro **	21,00±0,08
Fósforo **	488,27±0,32
Manganês **	3,43±0,01
Potássio **	157,09±0,26
Zinco **	6,72±0,12

\* Expresso em g/100g; \*\* Expresso em mg/100g

Os principais componentes do bagaço de malte são casca, pericarpo e semente, que são ricos em celulose, polissacarídeos não celulósicos e lignina além de algumas proteínas e lipídios. A casca também contém quantidades consideráveis de sílica e a maior parte dos compostos fenólicos do grão de cevada (SANTOS *et al.*, 2003).

Ao observar os resultados obtidos através da caracterização físico-química do bagaço de malte pode-se dizer que dois parâmetros se destacaram, dentre os analisados, sendo eles proteínas e fibra alimentar.

Em geral o bagaço de malte é considerado como um material lignocelulósico (rico em proteínas e fibras) sendo que o principais componentes

destes tecidos fibrosos são arabinoxilano, legnina (uma macromolécula de polifenóis) e celulose (um homopolímero linear de unidades de glicose) de acordo com Santos *et al.*, (2003).

Devido ao seu alto teor proteico este resíduo vem sendo muito utilizado como ração animal e alvo de muitas pesquisas com essa mesma finalidade. Segundo Silva *et al.*, (2010), consideráveis proporções de proteína encontradas nesse resíduo resistem à degradação no rumem, disponibilizando uma parcela significativa de proteína para a absorção no intestino delgado e posterior utilização pelo animal.

É importante destacar que a composição físico-química do resíduo pode variar de acordo com o processo de fabricação em cada indústria, matéria prima utilizada para produção de cerveja, condições de estocagem do malte, qualidade e tipo de adjuntos adicionados em processo de fabricação de cerveja, que podem ser modificado de acordo com a necessidade de fabricação ou com a época do ano (SANTOS *et al.*, 2003).

O estudo mostrou que o bagaço de malte tem alto teor de proteína e fibras, bem como consideráveis quantidades de elementos minerais, tais como fósforo e potássio, como pode ser visto na Tabela 1. O resultado do teor de proteína do bagaço de malte foi semelhante aos relatados por outros autores, 24,2% (SANTOS *et al.*, 2003), 24.0% (KANAUCHI *et al.*, 2001) e 15.2% (MUSSATTO & ROBERTO, 2005), confirmando o seu alto teor proteico.

Já em relação ao conteúdo de fibra alimentar, os resultados mostram uma quantidade significativa, sendo que quando inserido na dieta humana na forma de pães, biscoitos, sopas entre outros pode trazer benefícios para o consumidor.

O valor de fósforo encontrado neste trabalho (488 mg/100g) foi menor que o reportado por Meneses *et al.*, (2013), para o conteúdo de potássio o teor observado pelo mesmo autor (60 mg/100g) foi menor que obtido neste trabalho (157mg/100g).

## 4.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Uma vez que a maior parte dos compostos fenólicos dos grãos de cevada estão contidos na casca e ácidos hidroxicinâmicos são acumuladas nas paredes das celular, o bagaço de malte é uma fonte potencialmente valiosa de ácidos fenólicos. Os resultados para compostos bioativos do bagaço de malte podem ser visualizados na Tabela 2.

A extração dos compostos fenólicos presentes no bagaço de malte foi realizada utilizando soluções com diferentes concentrações de etanol (20-100% v/v) e reagente fenol de Folin-Ciocalteu.

TABELA 2 – COMPOSTOS BIOATIVOS

Análises	Bagaço de malte
Compostos fenólicos*	380, 28 ± 59,99
Flavonoides**	149,37± 0,09

\* Expresso em mg/100g EAG – Equivalente de ácido gálico, \*\* Expresso em mg/100g QE - Equivalente de quercetina

Pode-se observar na Figura 5 que os valores de fenólicos totais nos extratos de bagaço de malte, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG), apresentaram uma variação de 130,36 - 380, 28 mg EAG /100g. Para os valores de compostos fenólicos extraídos a 20, 40 e 60% v/v de etanol, não houve diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Portanto, considerou-se que a extração de 20% (v/v) (380, 28 mg EAG /100g) foi a mais eficiente para a extração de compostos fenólicos do bagaço de malte pois utiliza menos solvente orgânico e a grande quantidade de água aumenta a permeabilidade do tecido celular, portanto, permite uma melhor transferência de massa molecular por difusão e melhora a recuperação de compostos bioativos solúveis em água. Sendo esta concentração a que foi utilizada para todas as outras análises.



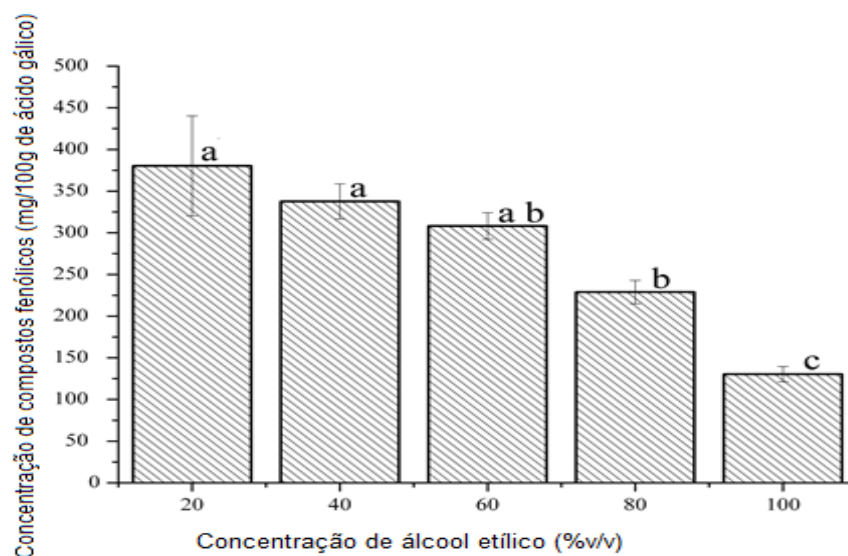


FIGURA 5 – CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁLCOOL ETÍLICO

As informações na literatura científica a respeito da determinação dos conteúdos totais de compostos fenólicos no bagaço de malte ainda são reduzidas. A maioria das pesquisas estão direcionadas ao estudo do grão de cevada ou a cerveja. Segundo Kähkönen *et al.*, (1999) em cereais o conteúdo de compostos fenólicos totais geralmente pode variar entre 20-130 mg/100g EAG. Os mesmos autores encontraram para o grão da cevada 400 mg/100g EAG ou seja, uma quantidade maior do que a maioria dos outros cereais. Como pode-se observar na Tabela 2 o resultado obtido para a determinação de compostos fenólicos no bagaço de malte foi muito próximo ao valor encontrado por Kähkönen *et al.*, (1999) para a cevada, desta forma pode-se dizer que após o processo de produção de cerveja ainda permanece uma quantidade significativa de compostos fenólicos no resíduo estudado.

O método de Folin-Ciocalteu não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados, tais como o ácido ascórbico e açúcares redutores. A escolha do padrão é um aspecto importante a ser considerado neste método. O número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. Estas interferências não são observadas na cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE), pois esta técnica é utilizada para qualificação e quantificação de compostos fenólicos (PIETTA, 2000; TARNAWSKI, 2006) . Por este motivo além de quantificar os compostos fenólicos pela metodologia de Folin-Ciocalteu também foram qualificados e quantificados por CLAE.

A partir do estudo realizado com as diferentes concentrações de álcool etílico como solução extratora (100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, etanol e água respectivamente) pode-se observar que a melhor extração para compostos fenólicos totais, que é o principal grupo de fenóis em cevada, foi obtido na proporção de 20:80, etanol e água respectivamente, com uma extração de  $380,28 \pm 59,99$  mg/100g EAG (Figura 5). A partir destes resultados utilizou-se esta concentração nas demais análises.

#### 4.3 FLAVONOIDES

Os flavonoides estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo os principais compostos bioativos encontrados em frutas. O amplo efeito benéfico dos flavonoides na saúde humana tem gerado interesse, sendo que estes estão diretamente relacionados à sua propriedade antioxidante, no entanto, existem poucos estudos sobre os flavonoides nos coprodutos gerados durante o processo de fabricação de cerveja, como com o bagaço de malte (MIRA *et al.*, 2002; STALIKAS, 2007). Deste modo a análise de flavonoides é extremamente importante para a caracterização do bagaço de malte.

Como pode-se observar anteriormente na Tabela 2, o bagaço de malte possui  $149,37 \pm 0,09$  mg/100g QE - equivalente de quercetina, enquanto em outros estudos , por exemplo, Meneses *et al.*, (2013) não obteve resultados para o teor de flavonoides em bagaço de malte extrato etanólico (20%), sendo uma quantidade significativa, já que em cevada, a maior contribuição para atividade antioxidante é proveniente do catequina, procianidina B3 e prodelfinidina B3 que são flavonoides (LEITÃO *et al.*, 2012).

Em estudo comparativo entre valores de flavonoides no bagaço de malte com outros resíduos, Negro *et al.* (2003) em vinícolas, foram

encontrados para bagaços de uvas vermelhas da variedade Negro Amaro, valores médios de flavonóides de  $3,94 \pm 0,08$  g/100g QE-equivalente de quercetina, demonstrando que a concentração de flavonoides observada no bagaço de malte, apesar de expressiva, é menor que no resíduo de vinícolas.

A presença de flavonoides em bagaço de malte é interessante porque eles são antioxidantes, atuando como agentes doadores de hidrogênio, com alto potencial redox e potencial redução quelante de metal (TSAO & YANG 2003).

Os flavonoides podem ser classificados em vários grupos, como o das antocianinas. Não existem estudos descrevam a presença de antocianinas em amostras de bagaço de malte. A partir de valores encontrados para antocianinas pela metodologia aplicada foi possível verificar que a concentração de antocianinas no bagaço de malte é de  $0,012 \pm 0,001$  mg/g.

#### 4.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NO BAGAÇO DE MALTE UTILIZANDO CROMATOGRAFIA GASOSA (CG)

Com o objetivo de identificar e quantificar os principais ácidos graxos presentes no bagaço de malte utilizou-se a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC).

Muitas substâncias ou compostos bioativos que podem ser encontrados em vegetais e em seus óleos têm ação funcional, capazes de proporcionar benefícios à saúde (SIRÓ *et al.*, 2008).

Os óleos vegetais podem conter ácidos graxos essenciais e teores significativos de outros compostos bioativos, tais como: tocoferóis, compostos fenólicos, fitosteróis e carotenóides que auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares através seus efeitos antioxidantes que protegem as biomoléculas da ação dos radicais livres (ETTINGER, 2010; ARRANZ *et al.*, 2008).

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos presentes na amostra foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos picos presentes no cromatograma com o tempo de retenção dos padrões.

Para a quantificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada normalização de área e os resultados expressos em porcentagem mg/g de ácidos graxos presentes, de acordo com trabalhos descritos por Visentainer & Franco (2006). Foram detectados cinco ácidos graxos principais, havendo a predominância dos ácidos graxos insaturados: ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Com relação aos ácidos graxos saturados, observou-se a presença de palmítico (16:0) e uma pequena quantidade de esteárico (18:0) (Tabela 3 e Figura 6).

Durante a maltagem e trituração, ocorrem apenas pequenas mudanças na composição de ácidos graxos, e por consequência, a composição de ácidos graxos do bagaço de malte é semelhante ao da cevada que apresenta elevado conteúdo de ácido palmítico e linoleico.(KAUKOVIRTA-NORJA *et al.*,1993; FEDAK *et al.*,1977).

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM mg/g DE LIPÍDIOS TOTAIS DE RESÍDUOS DA PRODUÇÃO DE CERVEJA.

ÁCIDO GRAXO	Quantidade (mg/g)
16:0	252,78 ± 0,57
18:0	9,81 ± 0,15
18:1 n9	103,71 ± 0,85
18:2 n6	566,74 ± 0,36
18:3 n3	43,47 ± 0,54
AGS <sup>1</sup>	262,99 ± 0,43
AGMI <sup>2</sup>	103,71 ± 0,85
AGPI <sup>3</sup>	610,21 ± 0,82
n6 <sup>4</sup>	566,74 ± 0,36
n3 <sup>5</sup>	43,47 ± 0,54
n6/n3	13,03 ± 0,10

<sup>1</sup> ácidos graxos saturados; <sup>2</sup> ácidos graxos monoinsaturados; <sup>3</sup> ácidos graxos poli-insaturados;

<sup>4</sup> ácidos graxos ômega 6; <sup>5</sup> ácidos graxos ômega3.

A Figura 6 mostra o cromatograma obtido para ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos a partir do bagaço de malte.

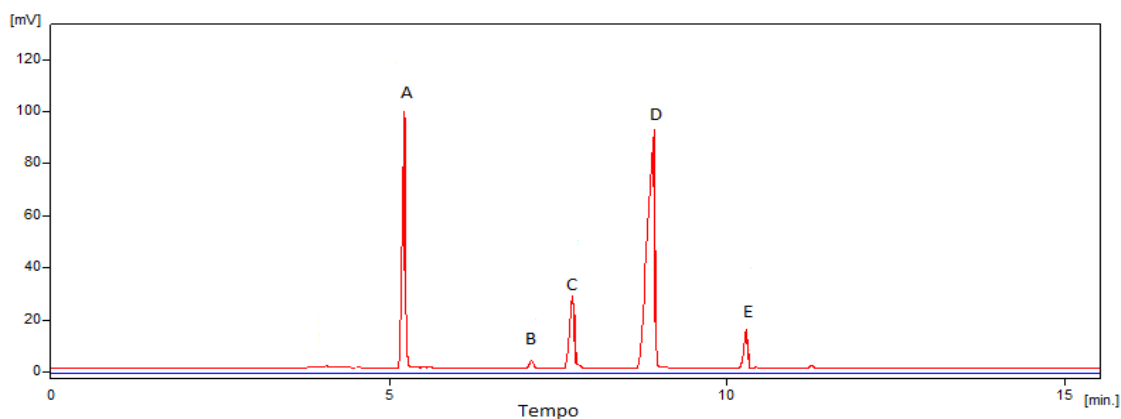


FIGURA 6 - CROMATOGRAMA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS ÉSTERES METÍlicos DE ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DE AMOSTRA DE BAGAÇO DE MALTE POR CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO DE CHAMA

NOTA: Compostos identificados: picos A. C16:0 (ácido palmítico); B. C18:0 (ácido esteárico); C. C18:1 (ácido oleico); D. C18:2 (ácido linoleico); E. C18:3 (ácido linolênico)

O ácido linoleico, pertence à família de Ômega 6, ácidos graxos insaturados essenciais que os seres humanos e outros animais devem ingerir porque o corpo não pode sintetizar. Além disso, o ácido linoleico, também é usado em produtos farmacêuticos e cosméticos por ter considerável influência nos processos metabólicos da pele e vitamina A e E além de propriedades de barreira do estrato córneo (HUANG *et al.*, 1999).

O teor de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados corresponderam a  $262,99 \pm 0,43$ ,  $103,71 \pm 0,85$  e  $610,21 \pm 0,82$  mg/g, respectivamente. O consumo de ácidos graxos presentes na cevada está relacionado com benefícios para a saúde. Além disso, óleos vegetais presentes em bagaço de malte contêm ácidos graxos essenciais e níveis significativos de outros compostos bioativos, tais como tocoferóis, fitoesteróis e carotenoides que ajudam na prevenção de doença cardiovascular através dos seus efeitos antioxidantes que protegem as biomoléculas da ação de radicais livre (ARRANZ *et al.*, 2008).

Os ácidos graxos predominantes identificados no bagaço de malte foram poliinsaturados responsáveis por 67,46% do total de ácidos graxos identificados, seguido de ácidos graxos saturados que somaram 26,92% e em

menor quantidade os ácidos graxos monoinsaturados, com 10,62%. Estes dados estão de acordo com estudos publicados anteriormente, que também encontraram uma predominância de ácidos graxos poliinsaturados (NIEMI *et al.*, 2012; DEL RÍO *et al.*, 2013).

A partir da composição química do extrato bagaço de malte, o mesmo pode ser visto como uma fonte interessante de ácidos graxos, enquanto que estes têm uma ampla gama de propriedades em produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosméticos e são também de interesse para outros setores industriais. Por exemplo, como ingredientes em alimentos funcionais que pode ser uma opção segura e prática para reduzir os níveis de colesterol no sangue, para a atividade preventiva do câncer, por exercerem efeitos citotóxicos em células cancerígenas (LIU *et al.*, 2012; QUÍLEZ *et al.*, 2013).

O alto teor de ácidos graxos presentes no bagaço de malte também faz com que esse resíduo possa ser uma matéria-prima utilizada na produção de biodiesel, que atualmente está em grande parte derivado de culturas oleaginosas (SINGH NIGAMA *et al.*, 2011).

Pode ser esperado que ocorram variações na composição do bagaço de malte de diferentes cultivares de cevada, malte e adição de adjuntos durante o processo de produção da cerveja (ROBERTSON *et al.*, 2010). Portanto, pesquisas adicionais devem ser direcionadas para verificar se estes resultados também são válidos para outras amostras de bagaço de malte.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CLAE

Grande parte dos compostos fenólicos encontrados na natureza são substâncias bioativas, sendo que as principais classes são os flavonoides e ácidos fenólicos (DAMODARAM *et al.*, 2010). A quantificação e qualificação de compostos fenólicos totais estão diretamente relacionadas à sua capacidade como antioxidante. Compostos fenólicos importantes no bagaço de malte foram determinados por CLAE. Os compostos fenólicos são de considerável interesse para os consumidores, devido à sua importância na qualidade dos alimentos, por possuir papel de proteção e prevenção em certos tipos de doenças. Eles

são principalmente classificados de acordo com o número de anéis de fenol que contêm, por exemplo, ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoides, ligninas e taninos (MCCARTHY *et al.*, 2013).

Os teores de compostos fenólicos do bagaço de malte determinados por CLAE no comprimento de onda de 280 nm e 370 nm podem ser observados na Figura 7 e os valores estão apresentados na Tabela 4.

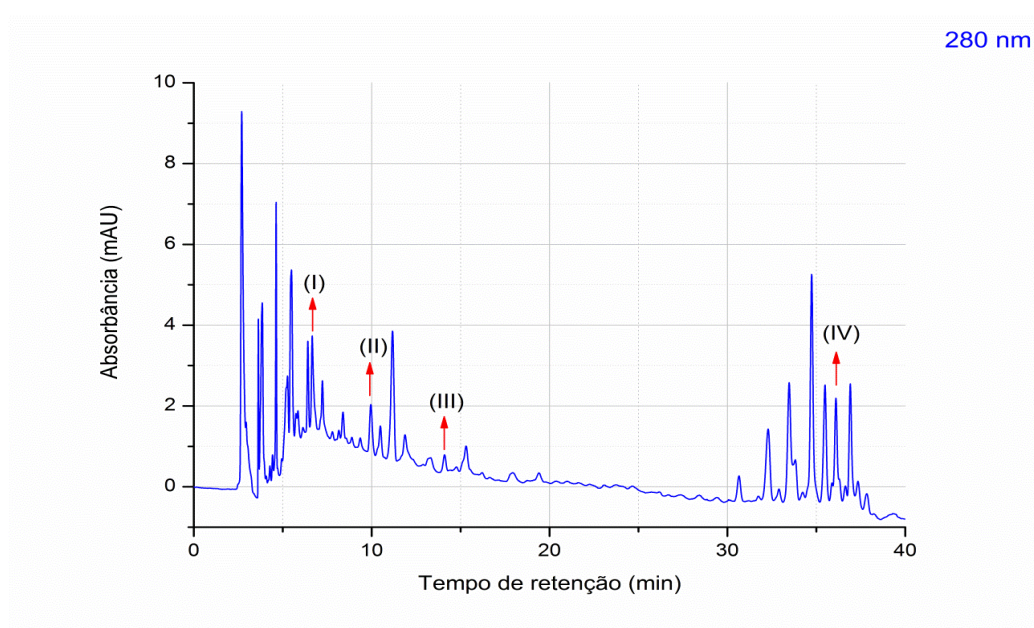


FIGURA 7 - CROMATOGRAMA DO BAGAÇO DE MALTE OBTIDO A 280 nm

TABELA 4 - Parâmetros cromatográficos dos compostos fenólicos analisados por CLAE no bagaço de malte.

Compostos Fenólicos	Tempo de retenção (min)	Bandas UV (nm)	DPR (%)	R <sup>2</sup>	mg/100g
Ácido Gálico (I)	6,65	280	0,826	0.998	3,22
Catequina (II)	9,95	280	0,909	0.997	8,44
Ácido Siríngico (III)	14,09	280	0,834	0.998	12,22
Caempferol (IV)	36,10	370	0,836	0.998	3,12

n=2, DPR – Desvio padrão relativo, R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação.

Os ácidos fenólicos, tais como os ácidos hidroxicinâmicos hidroxibenzóico e os fenóis são predominantes em bagaço de malte (MCCARTHY *et al.*, 2013).

A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas por comparação dos tempos de retenção e os dados de UV, com padrões de referência.

Os teores de compostos fenólicos determinados por CLAE variaram entre 3,12 e 12,22 mg/100g para o bagaço de malte. Dentre os compostos fenólicos determinado em teor significativo no bagaço de malte os flavonoides foram especificamente a catequina (8,44 mg/100g) e o caempferol (3,12 mg/100g). A catequina é um composto monomérico e antioxidante que devido à sua capacidade de sequestrar radicais livres e inibir a enzima lipoxigenase, promove o início da ruptura dos ácidos graxos insaturados. Quando moléculas monoméricas de fenóis são liberadas, elas podem se polimerizar, formando novos compostos fenólicos (BAMFORTH, 2000).

Além de flavonoides foram observados no bagaço de malte ácidos fenólicos tais como ácido gálico (3,22 mg/100g) e ácido sirínico (12,22 mg/100g).

É importante ressaltar que, a catequina, que foi determinada no bagaço de malte em quantidade significativa, apresenta maior atividade sequestrante de radicais superóxidos (WALTERS *et al.*, 1997).

Ao observar os resultados deve-se salientar que muitas variáveis devem ser levadas em conta tais como, método de extração, solução extratora utilizada e padrão utilizado para a quantificação dos compostos fenólicos.

Considerando a importância dos compostos fenólicos, como sequestradores de radicais livres, na prevenção de diversas doenças, o resíduo analisado pode ser considerado uma boa alternativa para aplicação em alimentos a serem introduzidos na dieta uma vez que apresentam teores significativos de compostos fenólicos.

A partir desta análise pode-se dizer que a catequina e o ácido sirínico são alguns dos compostos fenólicos presentes no bagaço de malte que contribuem para a atividade antioxidante deste resíduo.



#### 4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Muitos resíduos que podem ter características bioativas, por ter baixa popularidade e escassos conhecimentos sobre aplicações comerciais não vem recebendo muita atenção como fontes de antioxidantes naturais. Apesar desta situação, alguns estudos indicam que a utilização de fontes não exploradas pode resultar em muitos benefícios à saúde humana, contribuindo na diminuição de perdas econômicas e danos ambientais. Dentro destas situações englobam-se os resíduos agroindustriais (DIMITRIOS, 2006).

Merece destaque os resíduos da produção de cerveja, por ser a cerveja fonte de compostos fenólicos e pela expressiva quantidade de resíduo resultante do processamento durante o ano todo (VINSON *et al.*, 2003 e DIMITRIOS, 2006).

Numerosos ensaios podem ser utilizados para investigar as capacidades antioxidantes dos compostos naturais em alimentos. Desta forma foram realizados testes de atividade antioxidante do bagaço de malte por quatro diferentes métodos disponíveis, DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup>, ácido  $\beta$ -caroteno/linoleico e capacidade quelante do metal, sendo dois por métodos diretos ou de cinética química que é a reação de oxirredução entre o oxidante e o antioxidante como o  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e o ABTS<sup>•+</sup> e dois baseando-se em reações de transferência de elétrons sendo esses a atividade quelante do íon ferroso e DPPH<sup>•</sup> (HUANG *et al.*, 2005; KUSKOSKI *et al.*, 2005). Os resultados destes ensaios estão apresentados nas Figuras de 8 a 11.

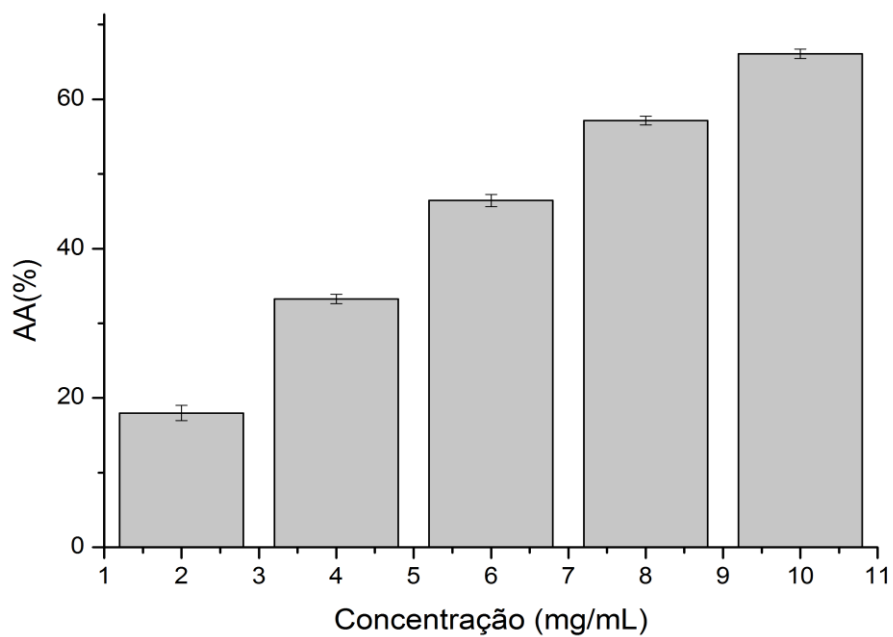


FIGURA 8 - DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO BAGAÇO DE MALTE PELO MÉTODO DE DPPH<sup>•</sup>.

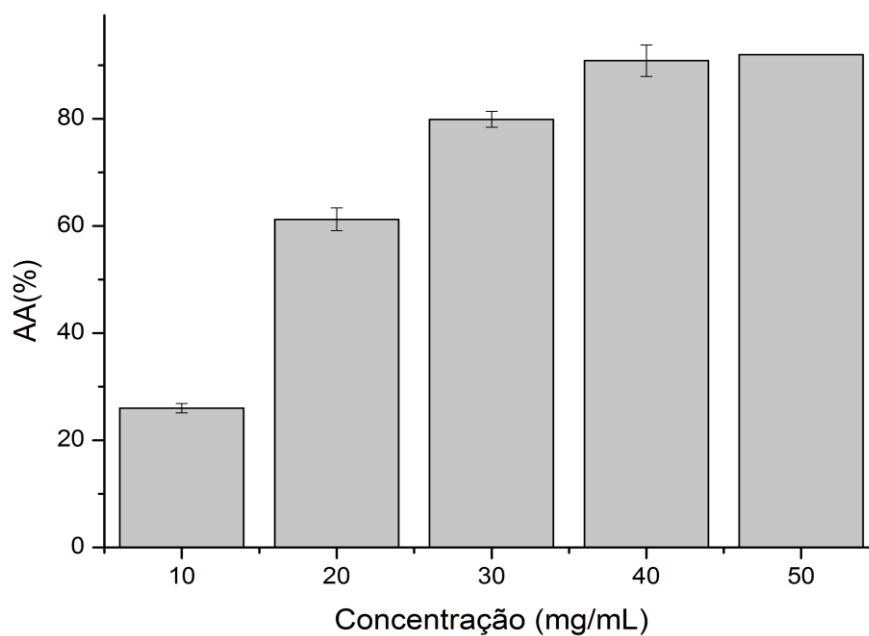


FIGURA 9 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE ATIVIDADE QUELANTE DO ÍON FERROSO.

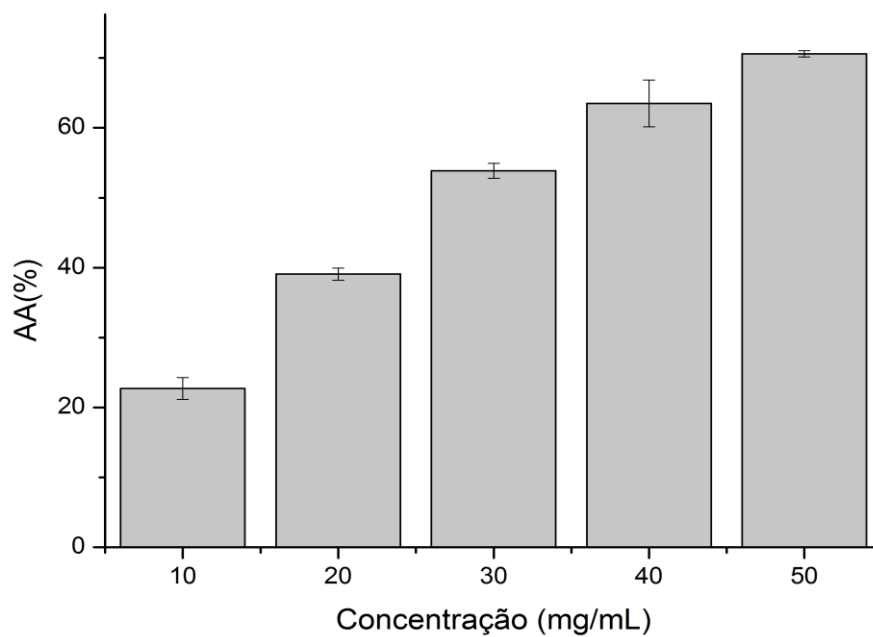


FIGURA 10 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE ABTS<sup>++</sup>.

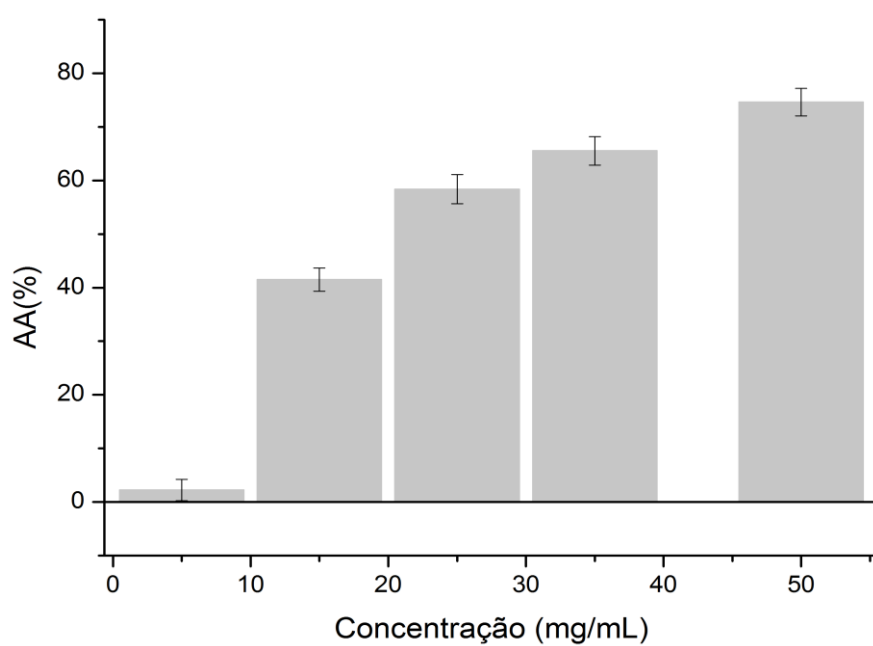


FIGURA 11 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE  $\beta$ -CAROTENO/ACIDO LINOLEICO.

Os métodos diretos (mecanismo de ação: oxirredução) mostram-se mais adequados para avaliação da atividade antioxidante, sendo os utilizados neste trabalho, ABTS<sup>•+</sup> e  $\beta$ -Caroteno/Ácido linoleico, para ABTS<sup>•+</sup> - EC<sub>50</sub> 26,10  $\pm$  0,80 (mg/mL) e para  $\beta$ -Caroteno/Ácido linoleico - EC<sub>50</sub> 21,11  $\pm$  1,20 (mg/mL) como pode ser observado nas Figuras 10 e 11. Para as análises de potencial antioxidante que utilizaram o mecanismo de ação indireto (reações de transferência de elétrons), os métodos utilizados foram atividade quelante do íon ferroso e DPPH<sup>•</sup>. O EC<sub>50</sub> encontrada para atividade quelante do íon ferroso foi de 16,32  $\pm$  0,10 (mg/mL) e para DPPH<sup>•</sup> - EC<sub>50</sub> 6,62  $\pm$  0,09 (mg/mL), conforme Figuras 8 e 9, sendo que para todos os testes foi utilizado ajuste logarítmico.

TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PARA O BAGAÇO DE MALTE POR DIFERENTES MÉTODOS

MÉTODOS	VALORES MÉDIOS EC <sub>50</sub> (mg/mL)	R <sup>2</sup>
DPPH <sup>•</sup>	6,62 $\pm$ 0,09*	0,9831
ABTS <sup>•+</sup>	26,09 $\pm$ 0,80*	0,9915
$\beta$ - CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO	21,11 $\pm$ 1,20*	0,9919
ATIVIDADE QUELANTE DO Fe	16,32 $\pm$ 0,10*	0,9762

\*Valores médios seguidos do desvio padrão, R<sup>2</sup> – Coeficiente de determinação.

Quando comparamos os métodos indiretos e diretos observamos que as análises que utilizam os métodos indiretos obtiveram valor de EC<sub>50</sub> menor que as baseadas no método direto, ou seja, a concentração efetiva necessária de bagaço de malte capaz de inibir em 50% a oxidação é menor, desta forma mais eficiente quando se utiliza métodos de determinação de atividade antioxidante que se baseia na reação de transferência de elétrons do que os métodos que se fundamentam na oxirredução. Apesar da atividade

antioxidante do bagaço de malte ter se mostrado maior nas análises com mecanismos de ação diretos, as de mecanismo de ação indireto também se mostraram eficientes como agente de oxirredução.

Os resultados deixam bem claro que o método que obteve a melhor resposta de atividade antioxidante para o bagaço de malte foi o DPPH<sup>•</sup> - EC<sub>50</sub> 6,62 ± 0,09 (mg/mL), que se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para o DPPH<sup>•</sup>, convertendo-o a sua forma reduzida. Nesta reação, a solução metanólica de DPPH<sup>•</sup>, inicialmente de coloração púrpura, torna-se descolorida, a descoloração indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre. Desta forma, avalia-se o poder redutor de um antioxidante, não sendo possível detectar a ação pró-oxidante de substâncias (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Os resultados foram expressos como EC<sub>50</sub>, que é a quantidade de antioxidantes necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH<sup>•</sup> da solução. Dessa forma, quanto menor o valor do EC<sub>50</sub>, menor terá sido o valor do extrato utilizado para reduzir o radical DPPH<sup>•</sup> e maior a sua atividade antioxidante (ANTOLOVICH *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2010).

Não foi encontrado na literatura científica estudos que determinem o EC<sub>50</sub> do bagaço de malte pela metodologia de DPPH<sup>•</sup>. Ao comparar os resultados obtidos na análise de atividade antioxidante por DPPH<sup>•</sup> para o bagaço de malte com outros resíduos agroindustriais como os cinco bagaços de uvas tintas (*Nero d'Avola; Nerello Mascalese; Nerello Cappuccio; Frappato e Cabernet Sauvignon*) estudado por Ruberto *et al.*, (2007) onde este obteve valores de EC<sub>50</sub> que variavam de 0,014 - 0,039 mg/mL e com diferentes extratos do bagaço de uva *Cabernet Sauvignon* estudados por Campos *et al.*, (2008) que observou EC<sub>50</sub> variando de 0,013 - 0,0108 mg/mL, pode-se dizer que o bagaço de malte possui uma menor atividade antioxidante que estes resíduos, porém essa atividade ainda é significativa.

#### 4.7 POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Como se pode observar na Tabela 6 e na Figura 13, os resultados mostraram que para as três bactérias e as quatro concentrações testadas, não foram observados halos de inibição, mostrando ausência de atividade antibacteriana nas concentrações testadas para as cepas de bactérias utilizadas neste estudo. Estudos com outros resíduos agroindustriais evidenciaram potencial antimicrobiano, como Baydar *et al.*, (2006) em sua pesquisa com sementes de uva desengorduradas. Muitas variáveis devem ser levadas em conta tais como, método de extração, bactérias testadas, concentração do extrato e composição fenólica que pode influenciar no resultado final. Deve-se levar em conta também a própria composição das amostras, pois o bagaço de malte é rico em açúcares, lipídeos e outros componentes que podem facilitar o crescimento da bactéria.

TABELA 6– POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO BAGAÇO DE MALTE

<b>Bactéria</b>	<b>Concentração</b>	0,01mg/mL	0,1mg/mL	1mg/mL	50 mg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>		Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Escherichia coli</i>		Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Salmonella typhimurium</i>		Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

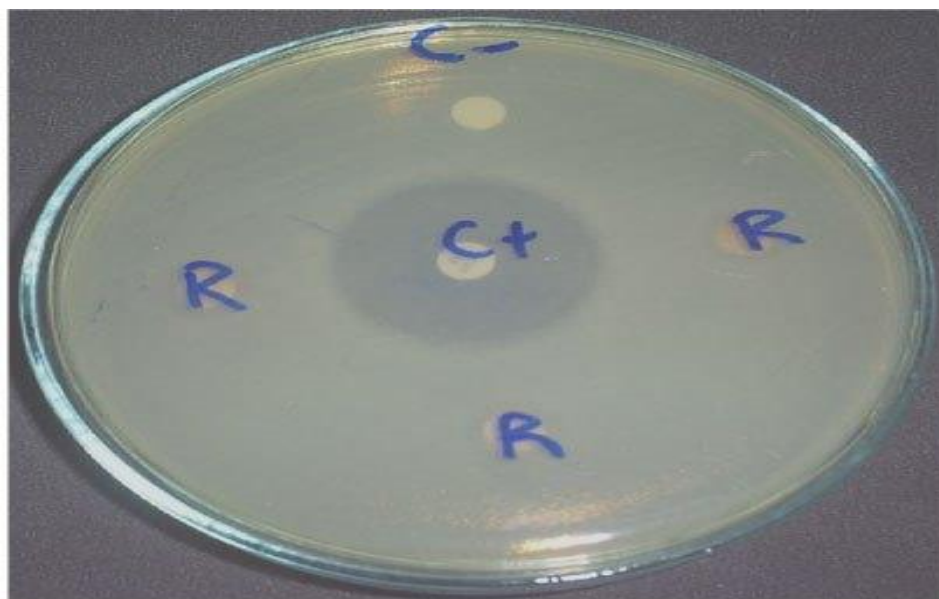


FIGURA 12 – ANALISE DE POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO BAGAÇO DE MALTE

NOTA: R Amostra 0,01mg/mL de bagaço de malte; C+ Controle positivo (Cloridrato de tetraciclina); C- Controle negativo (Solução extratora/20%etanol).

## 5 CONCLUSÕES

A partir deste trabalho pode-se inferir que dentre os parâmetros analisados na caracterização físico-químico do bagaço de malte dois deles se destacaram sendo eles proteínas e fibra alimentar.

O estudo observou que a melhor extração para compostos fenólicos totais foi a de álcool etílico e água (20:80) respectivamente, e mostrou que o bagaço de malte é um resíduo que possui compostos bioativos, sendo que os observados em maiores quantidades foram os flavonoides, catequinas e o ácido fenólico, ácido sirínico, apesar de apresentar também outros compostos como ácido gálico e caempferol.

Foi observado, que para todas as metodologias de determinação de atividade antioxidante testadas, tanto métodos diretos (ABTS<sup>•+</sup> e  $\beta$  – Caroteno/Acido linoleico), como métodos indiretos (atividade quelante do íon ferroso e DPPH<sup>•</sup>), houve diferença significativa entre elas, apesar de alguns métodos possuírem o mesmo mecanismo de ação.

Os métodos com mecanismos de ação indiretos obtiveram valores de EC<sub>50</sub> menores e consequentemente uma resposta de atividade antioxidante maior. Desta forma pode-se dizer que os compostos bioativos do bagaço de malte são mais efetivos quanto a sua reação de transferência de elétrons do que em relação a reação de oxirredução entre o oxidante e o antioxidante, desta forma destacando-se com melhor eficiência a metodologia do DPPH<sup>•</sup>

Na composição de ácidos graxos no bagaço de malte predominam os ácidos graxos insaturados: ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), porém contém também, ácidos graxos saturados, apesar de em menor teor, sendo esses os ácidos palmítico (16:0) e uma pequena quantidade de esteárico (18:0).

Para o estudo do potencial antimicrobiano do resíduo utilizado nesta pesquisa, não foi observado atividade antibacteriana em relação às bactérias (*S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*) e nas concentrações (0,01; 0,1; 1; 50 mg/mL) testadas.



Avaliando os resultados verifica-se a importância de estudos complementares para determinar composição de outros resíduos do processo de produção de cerveja e aplicação dos mesmos em alimentos.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, D. M. N. **Resíduo desidratado de cervejaria para suínos em crescimento e terminação**. Dissertação (Mestrado) – Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2009.
- ALIYU, S. & BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**. v.10, n.3, p.324–331, 2011.
- AMBEV. Cervejas. Fabricação. Disponível em: <<http://www.ambev.com.br>> Acesso em: março de 2013.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MACDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Journal Royal Society Chemistry**. v.127, p.183-198, 2002.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgard Blücher. v.5, 243p, 1983.
- ARAÚJO, L. F.; DIAS, M. V. C.; BRITO, E. A. de; JÚNIOR, S. O. Enriquecimento protéico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**. v.3, n. 3, p.47-53, 2009.
- ARRANZ S.; CERT R.; PÉREZ-JIMÉNEZ J.; CERT A.; SAURA-CALIXTO F. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. **Food Chemistry**. v.110, p.985-900, 2008.
- ARRANZ, S.; CERT, R.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; CERT, A.; SAURA-CALIXTO, F.; Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. **Food Chemistry**. v.110, p.985-900, 2008.
- ARUOMA, O. I.; GROOTVELD, M.; HALLIWELL, B. The role of iron in ascorbate-dependent deoxyribose degradation. Evidence consistent with a site specific hydroxyl radical generation caused by iron bound to the deoxyribose molecule. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.29, p.289-299, 1987.
- BAMFORTH, C. W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. **Chemistry Educator**. v.5, p.102-112, 2000.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**. v.45, p.493-496, 1966.
- BAYDAR, N.G.; SAGDIC, O.; OZKAN, G.; CETIN, S. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. **International Journal of Food Science & Technology**. v.41, n.7, p.799-804, 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W.; *CAN. J. Biochem. Physiol.* v.37, p.911,1959.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 144 p, 2001.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. SECRETARIA NACIONAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**. Acesso em: Março 2013.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_201202.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201202.pdf). Acesso em: Abril 2013.

BROCHIER, M. A.; CARVALHO. S. Aspectos ambientais, produtivos e econômicos do aproveitamento de resíduo úmido de cervejaria na alimentação de cordeiros em sistema de confinamento. **Ciência Agrotécnica**. v.33, n.5, p.1392-1399, 2009.

CABRAL FILHO, S.L.S. **Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatas**. Dissertação (Mestrado) – Univesidade de São Paulo. Piracicaba, 1999.

CAMPOS L. M. A. S.; LEIMANN, F. V.; PEDROSA, R. L.; FERREIRA, S. R. S. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). **Bioresource Technology**. v.99, p.8413–8420, 2008.

CARVALHO, B. M. ; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte – As Leveduras. **Revista Analytica Nº 25**. Outubro/ Novembro, 2006.

CARVALHO, B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2ª parte – As Leveduras. **Revista Analytica Nº 26**. Dezembro 2006/Janeiro, 2007.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 3ª parte – A Maturação. **Revista Analytica Nº27**. São Paulo Fevereiro/Março 2007.

CERVBRASIL, **Notícia**. Disponível em <http://www.cervbrasil.org.br>, Acesso em: Agosto de 2013.

CERVESIA. **Tecnologia Cervejeira**. Disponível em: <http://www.cervesia.com.br>. Acesso em: março-2013.

CHANG C.; YANG M.; WEN H.; CHERN J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.10, p.178-182, 2002.

CLARK, J. H.; MURPHY, M. R.; CROOKER, B. A. Supplying the protein needs of dairy cattle from by products feeds. **Journal of Dairy Science**. v.70, p.1092-1109, 1987.

CORTACERO-RAMIREZ, S.; CASTRO, M.H.B.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCESBLANCO, C.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analysis of beer components by capillary electrophoresis methods. **Trends in Analytical Chemistry**. v.22, n.7, p.440-445, 2003.

COSTA, L. M.; MOURA, N. F.; MARANGONI, C.; MENDES, C. E. TEIXEIRA, A. O. Atividade antioxidante de pimentas do gênero Capsicum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.30, p.51-59, 2010.

CRUZ, A. P. G. **Avaliação da influência da extração e microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante**. Dissertação de Mestrado (Programa de Pósgraduação em Bioquímica, Rio de Janeiro) UFRJ. 2008.

DAMODARAM, S.; PARKIN, L. K.; FENNEMA, R. O. **Química de Alimentos de Fennema**. 4º Ed. Rev. e Atualizado, 1088 p, 2010.

DEL RÍO, J.C.; PRINSEN, P.; ANA, G.; Chemical composition of lipids in brewer's spent grain: A promising source of valuable phytochemicals. **Journal Cereal Science**. v.58, p.248-254, 2013.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**. Cambridge, v. 17, p. 505–512, 2006.

DONNELI, J. K.; ROBINSON, D. S. Invited review free radical in foods. **Free Radical Res**. v.22, n.2, p.147-176, 1995.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.2, p.446-452, 2006.

EHRHARDT, P.; SASSEN, H. **A Cevada**. Senai-DR/RJ, Vassouras, 33p, 1995.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M. Antioxidant activity and phenolic contents of oat groats and hulls. **Cereal Chemistry**, São Paulo, v.76, n.6, p.902-906, 1999.

ETTINGER S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: **Mahan LK, Escott-Stump S. Alimentos, nutrição & dietoterapia**. São Paulo: Roca; 2010.

FEDAK, G., DE LA ROCHE, I., Lipid and fatty acid composition of barley kernels. Can. **Journal of Plant Science**. v.57 p.257–260, 1977.

FERNANDEZ-PANCHON, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA. Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Boca Raton, v.48, p.649-671, 2008.

FURIGO, A.; LAZZARI, M. L.; VIANA, P. J.; REFFATTI, F.; BAGNARIOILLI, B.; **Apostila Produção de cerveja**. Maio 2009.

GERON, L.J.V. **Caracterização química, digestibilidade, fermentação ruminal e produção de leite em vacas alimentadas com resíduo de cervejaria nas rações**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2006, 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2006.

GHISELLI, A.; Natella, F.; Guidi, A.; Montanari, L; Fantozzi. P; Scaccini, C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. v.11, p.76-80, 2000.

GIUSTI, M. M. & WROLSTAD, R. E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In WROLSTAD, R.E. (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. New York:Wiley, 2001.

GRANATO, D. KATAYAMA, FCU. de CASTRO IA. Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. **Food Chemistry**. v.129, p.366–373, 2011.

GRONBAEK, M.; Deis, A.; Sorensen, T. I.; Becker, U.; Schnohr P.; Jensen, G.; Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. **British Medical Journal**. v.310, p.1165-1169, 1995.

HALLIWELL, B. Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo. In: **Handbook of antioxidants**, 2. ed., Marcel Decker, USA: Enrique Cadenas e Lester Packer, p.31-33, 2002.

HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA R. M Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**. v.47, p.2023–2044, 2012.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in Flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v.52, p.481-504, 2000.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Laboratory practice**. v.22, p.474-476, 1973.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.1841-1856, 2005.

HUANG, F.C.; JU, Y.H.; CHIANG, J.C.; Gamma-Linolenic acid-rich triacylglycerols derived from borage oil via Lipase-catalyzed reactions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.76, p.833-837, 1999.

IACOPINI, P.; BALDI, M.;STORCHI,P.; SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.21, p.589–598, 2008.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. 1ª edição digital. São Paulo: IMESP, 2008.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; HAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plants extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.47, p. 3954-3962, 1999.

KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K.; ARAKI, Y.; Development of a functional germinated barley foodstuff from brewers' spent grain for the treatment of ulcerative colitis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v.59, p. 59–62, 2001.

KAUKOVIRTA-NORJA, A.; LAAKSO, S.; REINIKAINEN, P.; OLKKU, J.; Lipolytic and oxidative changes of barley lipids during malting and mashing. **Journal of the Institute of Brewing**. v.99, p.395–403, 1993.

KAUR, C. & KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. International. **Journal of Food Science and Technology**. v.36, p.703–725, 2001.

KELEBEK, H.; SELLI, S. Identification of phenolic compositions and the antioxidant capacity of mandarin juices and wines. **Journal Food Science and Technology**. (DOI: 10.1007/s13197-011-0606-7), 2012.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlim: VLB, 1997.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.;MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LEITAO, E.; MARCHIONI, M.; BERGAENTZLÉ, M.; ZHAO, L.; DIDIERJEAN, L.; MIESCH, E.; HOLDER, M.; MIESCH, S. Ennahar Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. **Journal of Cereal Science**. v.55, p.318-322, 2012.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)**. Tese (Doutorado)- Faculdade de

Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo 182p, 2008

LIU, L.; WINTER, K.M.; STEVENSON, L.; MORRIS, C.; LEACH, D.N. Wheat bran lipophilic compounds with in vitro anticancer effects. **Food Chemistry**. v.130 p.156-164, 2012.

MADRID, A. **Manual de Indústrias de alimentos**. 1.ed. São Paulo: Varela, 1996.

MAILLARD, M.N.; SOUM, M.H.; BOIVIN, P.; BERSET, C. Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. **LWT - Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie)**. v.29, p. 238-244, 1996.

MAISUTHISAKUL, P. e GORDON, M. Characterization and storage stability of the extract of Thai mango (*Mangifera indica* Linn. Cultivar Chok-Anan) seed kernels. **Journal of Food Science and Technology** (DOI: 10.1007/ s13197-011-0604-9), 2012.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.45, p.594-598, 1968.

MATAIX, J. La Cerveza, Tradición y Cultura Mediterránea. **Cerveza y Salud**. v.161, p. 41-44, 2004.

MCCARTHY, A.L.; CALLAGHAN, Y.C.O.; NEUGART, S.; PIGGOTT, C.O.; CONNOLLY, A.; JANSEN, M.A.K.; KRUMBEIN, A.; SCHREINER, M.; FITZGERALD, R.J.; O'BRIEN, N.M. The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. **Food Chemistry**. v.141, p. 2567–2574, 2013.

MENESES, N.G.T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J.A.; MUSSATTO, S.I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separation and Purification Technology**. v.108, p.152–158, 2013.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; dos SANTOS T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S. G. *Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method*. **Phytotherapy Research**. v.15 p.127-130, 2001.

MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P. AND LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.51, p.6887-6892, 2003.

MICHIELIN, E. M. Z.; SALVADOR, A. A.; RIEHL, C. A. S.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; SMÂNIA, E. F. A.; FERREIRA, S. R. S. Chemical composition and

antibacterial activity of *Cordia verbenácea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**. v.100, p.6615-23, 2009.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.48, p.91, 1971.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2 ed. Manole: São Paulo, 1999.

MIRA, L.; FERNANDEZ, M. T.; SANTOS, M.; ROCHA, R.; FLORENCIO, M. H.; JENNINGS, K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant activity. **Free Radical Research**. v.36, p.1199–1208, 2002.

MOREIRA, A. V. B. & MANCINI FILHO, J. Atividade Antioxidante das Especiarias Mostarda, Canela e Erva-doce em Sistemas Aquoso e Lipídico. **Nutrire – Revista Sociedade Brasileira Alimento Nutrição - Journal Brazilian Society Food Nutrition**. São Paulo, v. 25, p.44-45, 2003.

MUSSATTO, S.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**. v.43 p.1–14, 2006.

MUSSATTO, S.I. and ROBERTO, I.C., Acid hydrolysis and fermentation of brewers' spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture** (in press), 2005.

NAKANO, V. M. **Teoria da Fermentação e Maturação**. Brasília. Anais. Brasília: AMBEV, 2000.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, n.4, p.247-256, 2000.

NEGRO, C.; TOMMASI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. **Bioresource Technology**. v.87, n.1, p. 41-44, 2003.

NIEMI, P.; TAMMINEN, T.; SMEDS, A.; VILJANEN, K.; OHRA-AHO, T.; HOLOPAINEN-MANTILA, U.; FAULDS, C.B; POUTANEN, K.; BUCHERT, J.; Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.60, p.9910-9917, 2012.

PALLI, D. The effects of diet on DNA bulky adduct levels are strongly modified by GSTM1 genotype: a study on 634 subjects. **Carcinogenesis**. v.25, n.4, p.577-584, 2004.



PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**. v.39, p.791-800, 2006.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v.63 n7, p.1035-1042, 2000.

POEJO, P. L. P. **Avaliação da Atividade Antioxidante em diferentes tipos de bebidas: vinho e cerveja**. Dissertação (Mestrado) – Ciência e tecnologia de alimentos, Universidade Nova Lisboa, Lisboa, 2009.

QUÍLEZ, J.; GARCÍA-LORDA, P.; SALAS-SALVADÓ, J.; Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 22, p.343-351, 2003.

REINOLD, M. **Manual Prático de Cervejaria**. 1.ed. São Paulo : Aden, 1997.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de Alimentos**. 1º Ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 184 p. 2004.

ROSS, J. A.; KASUME, C. M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. **Annual Review Nutrition**. v. 22, p.19–34, 2002.

ROSSI JUNIOR, J. A.; SINGLETON, V. L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. v.16, n.3, p.144-158, 1965.

RUBERTO, G.; RENDA, A.; DAQUINO, C.; AMICO, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; TOMMASI N. D. Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. **Food Chemistry**. v.100, p.203–210, 2007.

SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J.J.; BARTOLOME, B.; GÓMEZ-CORDOVE, C.; DEL NOZAL, M.J., Variability of brewers' spent grain within a brewery. **Food Chemistry**. v. 80, p.17–21, 2003.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SENEVIRATHNE, M.; SIRIWARDHANA, N. Antioxidant Potential of *Ecklonia cava* on Reactive Oxygen Species Scavenging, Metal Chelating, Reducing Power and Lipid Peroxidation Inhibition. **International Journal of Food and Science Technology**. v.12, p.27–38, 2006.

SICOBÉ - Sistema de Controle de Produção de Bebidas. Produção cervejas e refrigerantes – Embalagem e região geográfica Disponível em <http://www.receita.fazenda.gov.br/pessoajuridica/bebidas/SistContrProdSicobe.htm>, Acesso em: Agosto de 2013.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. v.22, n.1, p.95-103, 1999.

SILVA, V. B.; FONSECA, C. E. M.; MORENZ, J. F. Resíduo Úmido de cervejaria na Alimentação de Cabras. **Revista Brasileira Zootecnia**. vol.39, n.7, p. 1595-1599, 2010.

SIM, K.H. e SIL, H.Y. Antioxidant activities of red pepper (*Capsicum annuum*) pericarp and seed extracts. **International Journal of Food and Science Technology**. v.43, n.10, p.1813-1823, 2008.

SINDICERVE, **Cervejas**. Fabricação. Disponível em [www.sindicerv.com.br](http://www.sindicerv.com.br), Acesso em: Fevereiro de 2013.

SINGH NIGAMA, P. and SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**. v.37, p.52-68, 2011.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA. E.; KÁPOLNA. B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: a review. **Appetite**. v.51, n.3, p.456-467, 2008.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v.30, p.3268-3295, 2007.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v.30, p.3268-3295, 2007.

STEINBERG, F. M.; BEARDEN, M. M.; KEEN, C. L. Cocoa and chocolate flavonoids: implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**. v.103, n.2, p.215-223, 2003.

SZABO, M.; IDITOIU, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical Papers**. v.61, p214–216, 2007.

TARNAWSKI, M.; DEPTA, K.; GREJCIUN, D.; SZELEPIN, B. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract – a natural immunomodulator. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.41, n.1, p.182-1888, 2006.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.19, p.669-675, 2006.

TORNIC, H.E. Da cevada à bebida. **Revista Alimentos e Tecnologia**. v.1, n.07, p.11-16, 1986.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F; CANDEIAS, J.A.N.; **Microbiologia**. 3 ed. Atheneu: São Paulo, 1999.

TSAO, R. & YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.1018 p.29-40, 2003.

TSCHOPE, Egon Carlos. **Micro cervejarias e Cervejarias: A História, a Arte e a Tecnologia**. 1.ed. São Paulo: Aden, 2001.

UNEP/ IE- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME / INDUSTRY AND ENVIRONMENT, **Environmental management in the brewing industry**. UNEP Technical Report Series nº33, UNEP, Paris, 1996.

VALGAS, C. **Avaliação de métodos de triagem para a determinação de atividade antimicrobiana de produtos naturais**. Florianópolis: UFSC, 2002. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

VAN ACQUIRE, S. A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**. v.20, n.3, p.331-342, 1996.

VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Cerveja. In: Almeida Lima, U., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. **Biotechnologia Industrial** (Biotechnologia na produção de alimentos). v.4, p. 91-144, Edgar Blücher, Brasil, 2001.

VENTURINI, W. F. G. (Coord). Bebidas Alcoólicas. **Ciência e Tecnologia** – São Paulo: Editora Blucher, v.1, 2010.

VIEIRA, A. W. **Apostila de Produção de Cervejas Artesanais**. VERSÃO: 0.4, 2009, disponível em <http://www.acervapaulista.com.br/> Acesso em: Agosto de 2013.

VINSON, J. A.; MANDARANO, M.; HIRST, M.; TREVITHICK, J. R.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v.51, n.18, p. 5528-5533, 2003.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B.; **Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação**. 1a ed, Varela: São Paulo, 2006.

WALKER, G. M. Yeast Metabolism. **Yeast Physiology and Biotechnology** (ed. John Wiley & Sons). v.26, p. 203-264, Wiley, Scotland, 2000.

WALTERS, M. T.; HEASMAN, A. P.; HUGUES, P. S. Comparison of (+)-catequin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer fl

avour stability. Part I: forced-aging. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v.55 n.2, p.43-89, 1997.

ZDUNCZYK, Z.; FLIS, M.; ZIELIŃSKI, H.; WRÓBLEWSKA, M.; ANTOSZKIEWICZ Z.; JUŚKIEWICZ, J.; In vitro antioxidant activities of barley, husked oat, naked oat, triticale, and buckwheat and their influence on the growth and biomarkers of antioxidant status in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.54, p.4168-4175, 2006.

ROBERTSON, J. A.; I'ANSON K. J. A.; TREIMO, J.; FAULDS C. B.; BROCKLEHURST T. F.; EIJSINKC V. G. H.; WALDRONA K. W.; Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. **LWT - Food Science and Technology**. v.43, p.890–896, 2010.